

# **Studien zur Struktur von S/MARs am Beispiel einer genomischen Domäne aus dem humanen Interferon-Gencluster**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

genehmigte  
**D i s s e r t a t i o n**

von Angela Knopp  
aus Erfurt

1. Referent:	Prof. Dr. J.Bode
2. Referent:	PD Dr. R.Hehl
eingereicht am:	23.11.2000
mündliche Prüfung (Disputation) am:	08.03.2001

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaft-lichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

**Bode, J., Benham, C., Knopp, A., and Mielke, C.** (2000). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10 (1), 73-90.

**Bode, J., Benham, C., Ernst, E., Knopp, A., Marschalek, R., Strick, R., and Strissel, P.** (2000). Fatal Connections: When DNA Ends Meet on the Nuclear Matrix. *J Cell Biochem*, im Druck

### Tagungsbeiträge

**Knopp, A., Schön, O., and Bode, J.** (1999). Functional analysis of independent transcription units exemplified by the human type I interferon gene cluster. (Poster) DHGP-Meeting, German Human Genome project 1999 Implications, Progress, and the Future.

**Bode, J., Bartsch, J., Benham, C., Janusch, H., Knopp, A., Olopade, F., Schön, O., Seibler, J., and Strissel, P.** 6th International Workshop on Chromosome 9 (Denver, CO, 27.10.1998) Functional analyses of independently regulated transcription units: the human type 1 interferon gene cluster. *Ann. Hum. Genet.* 63, 119-124 (1999).

**Bode, J., Baer, A., Knopp, A., Schübeler, D., Seibler, J., Benham, C., Baiker, A. and Lipps, H.J.** (1999). Scaffold/matrix attached regions (S/MAR elements): Detection and activities in vivo, 9. Workshop "Beyond the identification of transcribed sequences: Functional and expression analysis" (BITS) 28.-31.10. 1999, Reston, Virginia

**Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Knopp, A., Nehlsen, K., Schübeler, D., Seibler, J., Benham, C., Lipps, H.J., and Baiker, A.** (2000). Role of Scaffold/Matrix-attached Regions (S/MARs) for the Function of Autonomously-Regulated Chromatin Domains. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, München 10.-13.10.00.

**Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Knopp, A., Nehlsen, K., Benham, C., Lipps, H.-J., and Baiker, A.** (2000). Definition of autonomously regulated chromatin domains and utilization of their active elements. BITS-Meeting 2000.

**Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Knopp, A., Nehlsen, K., Benham, C., Lipps, H.-J., and Baiker, A.** (2000). Functional bordering elements in the human interferon gene cluster on 9p22 and their use for the improvement of transgenes, Projektleitertagung DHGP, Heidelberg, 30.11.-1.12.00.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Organisation des Chromatins .....	1
1.2. Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs) - maßgebliche DNA-Elemente für die Chromatinorganisation .....	4
1.2.1. Sequenz- und Struktureigenschaften von S/MAR-Elementen .....	5
1.2.2. Biologische Aktivität von S/MAR-Elementen .....	6
1.2.3. Methoden zur Vorhersage von S/MAR-Elementen .....	7
1.2.3.1. „Stress-Induced Duplex DNA Destabilization“ - Das SIDD-Profil .....	8
Superhelizität von DNA-Molekülen .....	8
1.2.3.2. Der „MAR-Finder“ .....	11
1.2.3.3. Der S/MAR-Test (Genomatix) .....	12
1.3. Interferone von Typ I und ihre biologische Aktivität .....	12
1.3.1. Der humane Typ I Interferon-Gencluster .....	12
1.3.2. Die biologische Funktion der Typ-I Interferone .....	14
1.3.3. Die humane Interferon- $\alpha$ -Domäne .....	14
1.4. Aufgabenstellung .....	17
<b>2. Ergebnisse .....</b>	<b>18</b>
2.1. Analyse der Chromatinstruktur der IFN $\alpha$ -Domäne unter Verwendung verschiedener „footprinting“-Methoden .....	18
2.1.1. „footprinting“-Methoden zur Strukturanalyse der DNA .....	19
2.1.2. Untersuchung der Eigenschaften von S/MAR-Elementen <i>in vitro</i> ...	23
2.1.2.1. Nachweis der S1 Nuklease-Aktivität mittels indirekter Endmarkierung im Southern-Blot .....	24
2.1.2.2. Nachweis der S1 Nuklease-Schnittstellen mittels LM-PCR mit Einzelnukleotid-Auflösung .....	26
2.1.3. Nachweis des Einzelstrang-Charakters der DNA in S/MAR-Elementen durch BAA-„footprinting“ .....	32
2.1.4. Nachweis des Einzelstrang-Charakters der DNA durch Kaliumpermanganat-„footprinting“ .....	35

2.1.4.1. Untersuchung des Einflusses der Ionenbedingungen auf den Einzelstrang-Charakter der DNA	26
2.1.4.2. $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung von Plasmid-DNA in unterschiedlichen Zustandsformen	38
2.1.4.3. Nachweis einzelsträngiger DNA-Bereiche mittels $\text{KMnO}_4$ -„footprinting“ <i>in vivo</i>	40
2.1.5. Identifizierung DNase I-hypersensitiver Stellen innerhalb der IFN $\alpha$ -Domäne	44
2.1.6. Identifizierung von Topoisomerase II-Schnittstellen innerhalb der IFN $\alpha$ -Domäne	47
2.2. Identifizierung und Untersuchung von für Sequenzierarbeiten an Chromosom 9 p21-22 geeigneten Bakterienklonen	50
2.2.1. Analyse der Chromosom 9 spezifischen Cosmid-Klone	51
2.2.2. Untersuchung Chromosom 9 spezifischer BAC- und PAC-Klone	53
2.2.3. Heutiger Stand der Arbeiten	55
<b>3. Diskussion</b>	<b>56</b>
3.1. S1 Nuklease-Sensitivität von Plasmiden mit eingebauten S/MAR-Elementen <i>in vitro</i>	56
3.1.1. S1 Nuklease Sensitivität des pTZ18R-Vektorrückgrates	57
3.1.2. S1 Nuklease Sensitivität des S/MAR800 im pCI-Plasmids	58
3.1.3. S1 Nuklease-Sensitivität des S/MAR-Elementes im pTZE2.2	60
3.2. Einzelstrang-Konformation der DNA <i>in vivo</i>	63
3.2.1. Nachweis des Einzelstrangcharakters der DNA in S/MAR-Elementen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> mit BAA	63
3.2.2. Nachweis von Einzelstrangcharakter mittels $\text{KMnO}_4$	65
3.2.2.1. Besonderheiten der $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung	65
3.2.2.2. $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung <i>in vivo</i>	67
Einzelstrangcharakter im S/MAR-Element	67
Nachweis von Einzelsträngigkeit <i>in vivo</i> an destabilisierten Bereichen innerhalb der Gendomäne	69
3.3. Nuklease-Sensitivität der IFN $\alpha$ -Domäne - Identifizierung DNase I hypersensitiver Stellen (DNase-HS)	70
3.4. Identifizierung der Erkennungsstellen von Topoisomerase II innerhalb der IFN $\alpha$ -Domäne	72

3.5. Das Sequenzierprojekt zur Entschlüsselung der genetischen Information auf dem humanen Chromosom 9 p21-22 . . . . .	73
Mithilfe bei der Vorbereitung der Sequenzierung des humanen IFN-Genclusters . . . . .	74
3.6. Ausblick . . . . .	74
<b>4. Material und Methoden . . . . .</b>	<b>76</b>
4.1. Geräte . . . . .	76
4.2. Material . . . . .	77
Filterpapiere und Transferfolien . . . . .	77
Autoradiographie . . . . .	78
Chemikalien . . . . .	78
Zellkulturmaterialien . . . . .	78
Computerprogramme . . . . .	78
4.3. Allgemeine Grundtechniken . . . . .	78
4.3.1. Sterilisieren . . . . .	78
4.3.2. Phenolisierung von Nukleinsäuren . . . . .	79
4.3.3. Fällung von Nukleinsäuren . . . . .	79
4.3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren - Fluorometrische Bestimmung . . . . .	79
4.4. Arbeiten mit <i>E.coli</i> . . . . .	79
4.4.1. <i>E.coli</i> -Stämme . . . . .	79
4.4.2. Kulturmedien für Bakterien . . . . .	80
4.4.3. Herstellung von Agarplatten . . . . .	80
4.4.4. Herstellung kompetenter Bakterien . . . . .	80
4.4.5. Elektrotransformation von <i>E.coli</i> . . . . .	80
4.4.6. Konservieren von Bakterienkolonien . . . . .	81
4.5. Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	81
4.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab . . . . .	81
„Boiling Prep“(nach Dan Cimbor, FHCR Seattle) . . . . .	81
4.5.2. Präparative Plasmidisolierung . . . . .	82
„Maxi“ Plasmidpräparation (Qiagen) . . . . .	82
4.5.3. Präparation von Cosmid- und PAC-DNA . . . . .	82
4.5.4. DNA-Rückgewinnung aus Gelen . . . . .	83
„QIAquick“ Gel Extraktions Kit . . . . .	83
4.5.5. Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen . . . . .	83

Quick-HMW-DNA .....	83
4.6. DNA-Modifizierung .....	84
4.6.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	84
4.6.2. Modifizierung mit $\text{KMnO}_4$ .....	84
4.6.3. Modifizierung mit S1 Nuklease .....	85
4.6.4. Modifizierung mit Bromazetaldehyd (BAA) und Chlorazetaldehyd (CAA) .....	85
4.6.5. Modifizierung mit DNase I .....	86
4.6.6. Modifizierung mit VP16 (Topoisomerase II-Inhibitor) .....	86
4.6.7. Auffüllen von 5'-überstehenden Enden .....	86
4.6.8. Dephosphorylierung .....	87
4.6.9. Ligation zur Transformation .....	87
4.7. Charakterisierung von Nukleinsäuren .....	87
4.7.1. „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) .....	87
4.7.2. “Ligation-mediated Polymerase Chain Reaction” (LM-PCR) .....	90
Primer-Extension .....	91
Ligation .....	91
PCR .....	91
4.7.3. Sequenzierung von DNA .....	93
4.8. Gelelektrophorese .....	94
4.8.1. Agarose Gelelektrophorese .....	94
4.8.1.1. Native Agarose Gelelektrophorese .....	94
4.8.1.2. Denaturierende Agarose Gelelektrophorese .....	95
4.8.2. Sequenziergele .....	96
4.8.2.1. Vorbereitung der Apparatur .....	96
4.8.2.2. Gießen des Gels .....	96
4.8.2.3. Lauf .....	96
4.9. Detektion DIG-markierter DNA - Nicht-radioaktive Nachweismethoden ....	97
4.10. Radioaktive Nachweismethoden .....	97
4.10.1. Markierung von DNA .....	97
Random priming mit "Rediprime DNA Labelling System" .....	97
4.10.2. „Southern Blotting“ .....	98
4.10.2.1. Transfer .....	98
4.10.2.2. Hybridisierung .....	99
Prähybridisierung und Hybridisierung .....	99
Waschen .....	99

Rehybridisierung .....	100
4.11. Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen .....	100
4.11.1. Verwendete Zelllinien .....	100
4.11.2. Medien und Lösungen .....	100
4.11.3. Kultivierung von Zelllinien .....	101
4.11.4. Passagieren .....	101
4.11.5. Langzeitlagerung von Zellen .....	101
4.11.6. Interferon-Induktion .....	102
4.11.6.1. Induktion mit Sendai-Virus .....	102
4.11.6.2. Bestimmung des Interferon-Titers .....	102
<b>5. Abkürzungen und Zeichen .....</b>	<b>103</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>107</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>126</b>
Liste der bearbeiteten Cosmid-Klone .....	126
Liste der bearbeiteten PAC-Klone .....	127
Liste der bearbeiteten BAC-Klone .....	128
Plasmide .....	128

Das Genom eukaryontischer Organismen unterliegt einer strikten Organisation, die eine effektive Regulation zellspezifischer Genexpression ermöglicht. S/MAR-Elemente sind die strukturellen Komponenten der DNA, die das Genom in unabhängig regulierbare Domänen gliedern und sowohl geregelte Replikation als auch gewebespezifische Expression ermöglichen. S/MARs erzielen diese Funktion offenbar durch Anheftung der DNA an die Kernmatrix - eine Funktion, die durch spezifische Struktureigenschaften determiniert wird. Hierbei kommt ihrer hohen Tendenz zur Ausbildung einzelsträngiger Bereiche besondere Bedeutung zu. Diese Eigenschaft liegt dem SIDD-Profil zugrunde, das gegenwärtig zur Vorhersage von S/MARs aus Sequenzdaten entwickelt wird.

In der vorliegenden Arbeit standen Analysen zur Chromatinstruktur von S/MAR-Elementen im Mittelpunkt. Die hierfür etablierten Methoden ermöglichten eine breite Anwendung unterschiedlicher „footprinting“-Reagenzien und gewährleisteten eine Feinanalyse bis auf das Nukleotidniveau. Zunächst wurden unter Verwendung der einzelstrangspezifischen S1 Nuklease zwei in ihren Sequenzeigenschaften sehr unterschiedliche S/MARs hinsichtlich ihrer Tendenz zur Strangtrennung analysiert. Ein Vergleich der *in vitro* Parameter mit dem SIDD-Profil zeigte, daß der Bereich der DNA-Duplex-Destabilisierung mit den tatsächlich vorhandenen Eigenschaften korreliert. Sekundärstrukturbildung kann jedoch zu einer Verschiebung der detektierten gegenüber der vorgesagten S1 Nuklease-Sensitivität führen.

Im Hauptteil der Arbeit wurde die Struktur der humanen IFN $\alpha$ -Domäne unter verschiedenen Blickwinkeln analysiert. Die Verwendung der einzelstrangspezifischen Chemikalien BAA und KMnO<sub>4</sub> ermöglichte den Nachweis, daß S/MARs auch *in vivo* Einzelstrangcharakter zeigen und daß dieser - mit gewissen Einschränkungen - durch das SIDD-Profil vorhersagbar ist. Die Bedeutung der Strangtrennung für die biologische Funktion der S/MARs wurde diskutiert.

Für die innerhalb der Gendomäne liegenden destabilisierten Sequenzabschnitte konnten Bereiche mit Tendenz zur Strangtrennung aufgezeigt werden. Gleichzeitig gelang der Nachweis, daß an den entsprechenden „Peaks“ DNase I-Hypersensitivität sowie Topoisomerase II-Aktivität vorliegt. Bei der Auswertung der Untersuchungen zur DNase I-Sensitivität in der IFN $\alpha$ -Domäne konnten die Schnittstellen endogener Nuklease von denen exogen zugeführter DNase I unterschieden werden. Letztere lassen sich mit den charakteristischen, destabilisierten Peaks am Rand des 5'S/MAR-Elementes korrelieren und konnten außerdem als Schnittstellen endogener Topoisomerase II-Enzyme identifiziert werden. Mit den Ergebnissen dieser Analysen ergab sich für das SIDD-Profil eine weitere Anwendungsmöglichkeit, d.h. es konnten auf seiner Grundlage dominante DNA-Struktureigenschaften beschrieben werden, deren DNase-Sensitivität mögliche regulatorische Funktionen anzeigt.

Im abschließenden Teil der Arbeit wird die Analyse von Klonen zur Vorbereitung der Sequenzierung des Interferon-Genclusters auf Chromosom 9 p21-22 beschrieben. Die Ergebnisse gingen in die erstellte physikalische Karte der Region ein und gelten in den beteiligten Sequenzierzentren als wertvoller Bestandteil des Quellenmaterials.

## 1. Einleitung

### 1.1. Organisation des Chromatins

Das genetische Material einer humanen Zelle, die genomische DNA, ist auf zwei mal 23 Chromosomen verteilt. Beide Chromosomensätze bestehen aus  $3 \times 10^9$  bp und würden in ausgestrecktem Zustand eine Länge von je 1 m erreichen. Um diese große DNA-Menge im Zellkern unterzubringen, ist eine hochorganisierte Komprimierung und Strukturierung notwendig, die in der Zelle durch Assoziation mit verschiedenen Proteinen erreicht wird. Die größte Fraktion dieser Kernproteine bilden die basischen Histone. Die genomische DNA, an die Histone gebunden sind, bezeichnet man als Chromatin. Mikroskopisch unterscheidet man zwei unterschiedlich stark kondensierte Formen des Chromatins. Das Euchromatin liegt während der Interphase des Zellkerns nur schwach kondensiert vor und beinhaltet zumeist aktiv transkribierte Gene. Das viel dichter erscheinende Heterochromatin ist während des gesamten Zellzyklus stark kondensiert, wobei einige Bereiche in ihrer Verpackungsdichte dynamisch sind, abhängig vom Differenzierungsstatus und Entwicklungsstadium der Zelle. Die Struktur des Chromatins bestimmt die Zugänglichkeit einzelner DNA-Bereiche und beeinflusst auf diese Weise die Expression der Gene.

Die erste Verpackungsstufe der DNA bilden die Nukleosomen, in denen 146 bp um einen Komplex aus 8 Histonen (H2A, H2B, H3, H4)<sub>2</sub> gewunden sind (Richmond et al., 1984). Dadurch wird eine 7fache Komprimierung erreicht. Die Assoziation der Histon-Proteine mit der DNA wird durch verschiedene Modifikationen beeinflusst. Es können Methylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen der einzelnen Nukleosom-Bestandteile erfolgen und einen entscheidenden Einfluß auf Transkriptionsmechanismen ausüben (Übersicht in Davie, 1998). So führt die durch Vermittlung einiger Transkriptionsfaktoren eingeführte Acetylierung von Lysinresten zu einer Verminderung der positiven Ladung der Proteine und als Konsequenz daraus zu einer Abschwächung der Bindung zur negativ geladenen DNA (Spencer und Groudine, 1997; Wade et al., 1997; Davie, 1998). Als Folge ist der Zugang der Transkriptionsmaschinerie zur nukleosomalen DNA erleichtert (Bode et al., 1986; Wolffe und Pruss, 1996).

Ebenso wie die Bindungsstärke der Histone führt auch die Festlegung der Position der eigentlich frei verschiebbaren Nukleosomen zu einer Beeinflussung der Transkriptionsvorgänge. Regulatorische Regionen von Genen sind meist frei von Histonen, was durch die exakte Positionierung benachbart liegender Nukleosomen erreicht werden kann (Grunstein, 1990). Solche positionierten Nukleosomen sind im 5'Bereich des humanen Interferon- $\alpha$ -Promotors (Bode et al., 1986) und im MMTV-Promotor (Richard-Foy et al., 1987; Archer et al., 1991) nachgewiesen worden. Ein Festhalten des Histon-Oktamers an einer Stelle des DNA-Stranges kann durch spezifische Transkriptionsfaktoren erreicht werden. So ist die Abhängigkeit der Position einzelner Nukleosomen von der Transkriptions-Aktivität und dem Acetylierungsgrad der Histone

beschrieben worden (Armstrong und Emerson, 1998). Außerdem kann die DNA-Sequenz selbst die Position der Nukleosomen bestimmen, denn spezifische Sequenzmotive, die zu einer gebogenen DNA-Konformation führen, erleichtern die enge Wicklung der DNA um den Histonkomplex (Simpson, 1986; Travers, 1987). Eine solche „Curvature“ wird durch das Auftreten von AT-Motiven ( $AAAAN_6AAAA\ N_7AAAA$ ;  $T_mA_n$ ) oder TA-, TG- und CA-Dinukleotiden in wiederkehrenden 10,5 bp-Abständen hervorgerufen (Koo et al., 1986; Trifonov, 1980 und 1986).

Ein typisches Merkmal aktiv transkribierten Chromatins ist die hohe Sensitivität gegenüber endonukleolytischen Enzymen. Die aufgelockerte Struktur dieser Bereiche erlaubt einen leichten Zugang der Enzyme zur DNA. Besonders die Sequenzen zwischen den Nukleosomen sind sensitiv für Abbau durch „mung bean“-Nuklease oder DNase I. Regulatorisch wirksame Regionen sind häufig durch Bereiche besonders starker Sensitivität gegenüber DNase I charakterisiert. Solche DNase I hypersensitiven Stellen (DNase-HS) sind Regulationszentren, die freigehalten werden von Nukleosomen und so für die Bindung anderer Proteine offen stehen. Ein prominentes Beispiel sind die fünf DNase-HS im 5' Bereich des humanen  $\alpha$ -Globingenclusters, die als „locus control region“ (LCR) fungieren und die Entwicklungs- und Zelltyp-spezifische Expression der Gene des Clusters regulieren. Eine Deletion dieser Bereiche führt zu einer Inaktivierung der Genexpression, die sich auch durch Veränderung der allgemeinen DNase I-Sensitivität der Region bemerkbar macht (Übersicht in Higgs, 1998).

Die zweite Verpackungsstufe des Chromatins, die zum Heterochromatin führt, wird durch Bindung eines fünften Histon-Proteins, des Histons H1, an die zwischen den Nukleosomen liegende ca. 60 bp lange „linker“-DNA erreicht. Auf diese Weise werden die Partikel innerhalb einer 30 nm Faser dicht gepackt, und es entsteht eine Komprimierung um das 40fache. Die räumliche Anordnung der Nukleosomenkette wird durch verschiedene Modelle beschrieben (Felsenfeld und McGee, 1986, Thoma, 1988). Das populäre Solenoid-Modell von Finch und Klug (1976) geht von einer spiralförmigen Aufwicklung der Nukleosomen aus, so daß ein Zylinder von ca. 300D entsteht. Eine Zylinderwindung wird in diesem Modell durch sechs Nukleosomen gebildet, wobei das H1-Histon im Inneren der Faser zu liegen kommt. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen H1-Molekülen sorgen für eine Stabilisierung der Struktur, die so kompakt ist, daß keine Zugänglichkeit für regulatorische Proteine mehr besteht: Transkription, Translation und Replikation können nicht mehr ablaufen.

In einer weiteren Kondensationsstufe liegt die DNA schlaufenförmig in der sogenannten „loop“-Anordnung vor. Die Schleifen werden durch Bindung der DNA an die Kernmatrix gebildet. Sie sind im Elektronenmikroskop nach Beseitigung der Histone sichtbar. In Metaphase-Chromosomen sind diese Schlaufen extrem dicht in radialer Anordnung gepackt. Durch diese superkompakte Struktur wird eine organisierte Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen während der Mitose ermöglicht.



In der Interphase sind die Chromatinschleifen viel stärker entfaltet. Über die Faltungsvorgänge beim Übergang zwischen Metaphase-Chromosom und Interphase-Chromatin und umgekehrt ist so gut wie nichts bekannt. Mittlerweile ist jedoch anerkannt, daß die Schleifen strukturelle Domänen bilden, die sowohl topologisch als auch hinsichtlich der Expression der innerhalb der „loops“ gelegenen Gene unabhängig reguliert werden (Zehnbarer und Vogelstein, 1986).

Die Kernmatrix, an der die Chromatinschleifen verankert sind, ist ein dem Cytoskelett analoges dynamisches Gerüst aus Proteinen und RNA. Dieses Gerüst wurde als „nuclear matrix“ (Berezney und Coffey, 1974), „nuclear scaffold“ (Paulson und Laemmli, 1977), „nucleoskeleton“ (Miller et al., 1978) oder „nuclear matrix-pore complex lamina fraction“ (NMPCL, Fisher et al., 1982) bezeichnet. Die im Gegensatz zu den Histonen unlöslichen Proteinbestandteile der Kernmatrix können durch zwei Methoden isoliert werden. Die Hochsalzextraktion mit 2 M NaCl, welche 1974 von Berezney et al. beschrieben wurde, ist später vielfach durch die schonendere Extraktion mit dem Detergenz-ähnlichen LIS-Salz (Lithium-3',5'-diiodosalicylat; Mirkovitch et al., 1984) ersetzt worden. Durch die hierbei verwendeten physiologischen Ionenbedingungen können Artefakte vermieden werden. Die isolierte Kernmatrix enthält neben dem inneren Proteingerüst auch Lamine und Reststrukturen des Nukleolus. Zu den Proteinbestandteilen der „nuclear matrix“ gehören sowohl strukturelle als auch regulatorisch wirksame Proteine. Zu den bekanntesten strukturgebenden Proteinen gehören die Intermediär-Filament-bildenden Lamine A-C (Ludérus et al. 1992 und 1994). Topoisomerase II, das in vielen Zellen am häufigsten auftretende Enzym, ist ein sowohl regulatorischer als auch strukturgebender Proteinbestandteil (Gasser et al., 1986; Mirkovitch et al., 1988). Durch Veränderung der DNA-Topologie ist dieses Enzym in der Lage, Einfluß auf die Struktur und die damit verbundene Zugänglichkeit der DNA zu nehmen, und die Expression verschiedener Gene zu regulieren.

Weitere enzymatisch wirksame Kernmatrixproteine sind die DNA Polymerasen  $\alpha$  und  $\beta$  (Foster und Collins, 1985), RNA Polymerase II (Lewis et al., 1984) und DNA Methyltransferasen (Burdon et al., 1985). Darüber hinaus wurden auch Histon-Deacetylasen und Acetyltransferasen als Teil der Matrix isoliert (Hendzel et al., 1991 und 1994). Die Komposition des Kerngerüsts aus strukturgebenden und an grundlegenden, biologischen Prozessen mitwirkenden Proteinen führte zu der heute verbreiteten Ansicht, daß die Kernmatrix eine Art Plattform für diverse nukleär ablaufende Prozesse darstellt, die DNA, RNA und Proteine räumlich miteinander verbindet. Immer mehr isolierte Kernmatrix-Proteine scheinen so auch regulatorische und strukturelle Funktionen in sich zu vereinen. Zu diesen Proteinen zählen z.B. SAF-A/hnRNP-U, SAF-B (Romig et al., 1992; Renz et al., 1996), SATB1 (Dickinson et al., 1992 und 1997), ARBP-/MeCP2 (von Kries et al., 1991; Weitzel et al., 1997), HMG I(Y) und NuMA (Zeng et al., 1994). Für SAF-B sind neben der DNA-Bindungseigenschaft auch Funktionen bei Splice-Vorgängen nachgewiesen worden (Nayler et al., 1998). SAF-A wiederum weist neben der DNA-

Bindungsdomäne eine RNA-bindende RGG-Box auf und ist bei der Verpackung der hnRNA beteiligt (Fackelmayer et al., 1994). Nucleolin ist ein weiteres Protein mit zusätzlicher RNA-Bindungskapazität. Es spielt sowohl bei der rDNA Transkription, rRNA Verpackung als auch bei der Ribosomen-Formation eine Rolle (Übersicht in Bode et al., 2000).

Einige der früher als Hauptbestandteile der Kernmatrix beschriebenen hnRNP-Proteine, die ursprünglich durch ihre Assoziation mit wachsenden RNA Polymerase-Transkripten und die Formation zu hnRNP-Komplexen identifiziert worden waren, fand man später erneut aufgrund ihrer DNA-Bindungseigenschaften (Mattern et al., 1996). So erwies sich das 1992 nachgewiesene DNA-bindende Matrixprotein SAF-A als der früher als hnRNP-U bezeichnete Bestandteil der hnRNP-Partikel (Fackelmayer et al., 1994).

Die angeführten Beispiele veranschaulichen deutlich die vielfältigen Funktionen der Proteine der Kernmatrix. Die grundlegende Eigenschaft des Kerngerüsts bei der Chromatinorganisation ist jedoch die Verankerung der DNA und viele der Kernmatrix-Proteine zeichnen sich durch spezifische Affinität zu bestimmten DNA-Bereichen aus (SAF-A/B, SAT-B1, ARBP). Diese DNA-Abschnitte werden als „Scaffold/Matrix Attachment Regions“ (S/MAR) bezeichnet und sind die strukturgebenden DNA-Elemente bei der Ausprägung der Schlaufenstruktur. Für SAT-B1, SAF-A und p53<sup>mut</sup> konnte durch „crosslinking“-Experimente eine *in vivo*-Bindung an die S/MAR-Elemente nachgewiesen werden (de Belle et al., 1998; Gohring und Fackelmayer, 1997; Deppert et al., unveröffentlicht).

## **1.2. Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs) - maßgebliche DNA-Elemente für die Chromatinorganisation**

S/MAR-Elemente wurden aufgrund ihrer Eigenschaft, an die Kernmatrix zu binden, isoliert. Für ihre Identifizierung stehen zwei biochemische Verfahren zur Verfügung. Bei der als „halomapping“ bezeichneten Isolierung endogener S/MARs wird die schon erwähnte LIS-Extraktion zur Gewinnung von Scaffold-Strukturen durchgeführt. Als Ergebnis erhält man die von Histonen und anderen Proteinen befreite Kernmatrix, die von der genomischen DNA in einer als „Kern-Halo“ bezeichneten Wolke umgeben wird. Nach Verdau mit Restriktionsenzymen und Abtrennung der freigewordenen DNA durch Zentrifugation können die assoziierten Bereiche in einem Southern-Blot identifiziert werden. Bei den sogenannten Reassoziationsexperimenten, der zweiten möglichen Methode zur S/MAR-Identifizierung, werden die auf ihre Bindungseigenschaften zu testenden Fragmente mit einer wie oben beschrieben hergestellten Kernmatrixpräparation inkubiert. Die Affinität der Fragmente zur Kernmatrix *in vitro* in Gegenwart prokaryontischer, S/MAR-freier Kompetitor-DNA gibt Auskunft über die Stärke der Bindungseigenschaften und kann als standardisierter Test bei der Untersuchung von unterschiedlichsten DNA-Sequenzen eingesetzt werden (Kay und Bode, 1995). Ursprünglich wurden die in „halo-

mapping“-Experimenten identifizierten Elemente als SARs bezeichnet (Gasser und Laemmli, 1986) und standen den durch Reassoziationsanalysen an durch Salzextraktion präparierten Kernmatrices gefundenen MARs gegenüber (Cockerill und Garrard, 1986). Durch eine Vielzahl von Untersuchungen zeigte sich, daß bei beiden Methoden die gleichen Elemente nachgewiesen werden, und als Konsequenz wurde der Begriff „S/MAR“ für die Kernmatrix-bindenden DNA-Bereiche geprägt.

Durch die Anwendung der biochemischen Nachweismethoden konnte gezeigt werden, daß S/MAR-Elemente in der genomischen DNA aller eukaryontischen Organismen vorhanden sind. Sowohl in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* (Amati et al., 1990) als auch im Genom von *Drosophila melanogaster* (Mirkovitch et al., 1984; Gasser und Laemmli, 1986b) und in verschiedenen Pflanzen, wie im Tabak (Hall et al., 1991), in der Petunie (Dietz et al., 1994), im Mais und in *Arabidopsis thaliana* (Paul und Ferl, 1998) wurden S/MARs identifiziert. Der überwiegende Anteil bekannter Elemente wurde jedoch aus tierischen Organismen und menschlicher DNA isoliert. Erwähnt seien hier beispielhaft die S/MARs der Lysozymdomäne des Huhns (Phi-Van und Strätling, 1988), die Elemente in den Loci der murinen Immunglobulin- und  $\alpha$ -Interferon-Gene (Cockerill et al., 1986, 1987 und 1990; Mielke et al., 1990), im DHFR-Locus des Hamsters (Käs und Chasin, 1987; Dijkwel et al., 1988) sowie im  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin- und im Interferon-Gencluster beim Menschen (Jarman und Higgs, 1988; Bode et al., 1988; Strissel et al., 1998). Die dargestellte Auswahl zeigt, daß die S/MARs in höheren Organismen häufig an der Organisation komplexer Genloci beteiligt sind.

### 1.2.1. Sequenz- und Struktureigenschaften von S/MAR-Elementen

Viele S/MARs zeichnen sich durch einen hohen AT-Gehalt von ca. 70% aus, der aber weder für die Bindung ausreichend ist noch als Identifikationskriterium verwendet werden kann. Die Elemente sind ausschließlich in nicht-kodierenden DNA-Bereichen zu finden. Häufig liegen sie an den Domänengrenzen der Genloci, aber auch in Introns einiger Gene sind S/MARs identifiziert worden (Jarman und Higgs, 1988; Cockerill et al., 1987). Ansätze, Konsensussequenzen zu definieren, können nur auf eine begrenzte Auswahl von Elementen angewendet werden (van Drunen et al., 1999). Bisher gelang es nicht, eine allgemein gültige Konsensus-Sequenz nachzuweisen, die zur Vorhersage der S/MARs dienen könnte. Einzig die biochemischen Analysen bieten eine gesicherte Methode zum Nachweis. Trotz des Fehlens deutlicher Homologien konnten einige häufig auftretende Sequenzmotive identifiziert werden. So findet man vielfach Bindungsstellen für Topoisomerase II innerhalb der Matrix-bindenden Sequenzen. Käs und Lamml (1992) konnten eine hohe Topoisomerase II-Aktivität an den Elementen des *Drosophila* Histon-Genclusters *in vivo* nachweisen. Die Übertragung der Topoisomerase II-Konsensussequenzen auf die Positionen der tatsächlichen Enzymaktivität ist allerdings problematisch, da Käs und

Laemmli (1992) außerdem zeigten, daß die *in vivo* verwendeten Schnittstellen eher durch Chromatinstrukturen als durch Sequenzmotive determiniert werden.

Ein weiteres typisches Sequenzmotiv vieler S/MARs ist das ATATTT-Motiv, welches zum ersten Mal von Cockerill und Garrard (1986) und später nochmals von Mielke et al. (1990) nachgewiesen wurde. Des weiteren treten gehäuft Motive auf, die zu einer gebogenen DNA-Konformation („bending“) führen (Anderson, 1986; Homberger, 1989), und auch poly(dAdT)–Bereiche wurden als typische Merkmale für S/MAR-Elemente beschrieben (Adachi et al., 1989; Käs et al., 1989). Intensive Sequenzanalysen wurden von Boulikas und Kollegen durchgeführt. In einer zusammenfassenden Darstellung von 1995 sind viele der bisher gefundenen Motive diskutiert worden. Boulikas konnte außerdem zeigen, daß „Inverted Repeat“-Sequenzen in einer Gruppe von S/MARs außerordentlich häufig auftreten.

1992 demonstrierten Bode et al., daß S/MARs eine hohe Tendenz zur Ausbildung von Einzelstrang-Konformation besitzen. Diese Eigenschaft scheint das erste allgemein gültige Merkmal aller bisher untersuchten Elemente zu sein. Hauptsächlich auf dieses Kriterium stützen sich die mittlerweile entwickelten Computerprogramme zur Vorhersage von S/MAR-Elementen. In Kapitel 1.2.3. werden die Prinzipien und Vorgehensweisen, die dabei verwendet werden, näher diskutiert. Die Strangtrennung innerhalb der S/MAR-Sequenzen scheint von einigen „core unwinding“-Zentren auszugehen. Im Mittelpunkt dieser Bereiche stehen AT-reiche Motive, wie das von Bode et al. identifizierte AATATATTT-Motiv. Ausschlaggebend für die Fähigkeit zur Assoziation mit der Kernmatrix ist anscheinend die Länge des Fragmentes. In den Experimenten von Mielke et al. (1990) konnte für ein 150 bp-Fragment des 5' vom Interferon- $\alpha$ -Gen gelegenen S/MAR keine Bindung mehr nachgewiesen werden. Künstliches S/MARs, die durch Multimerisierung dieses Elementes oder der 25 bp „core-unwinding“-Sequenz des IgH-Gen-assoziierten S/MAR hergestellt wurden, zeigten hingegen volle Affinität zur Kernmatrix. Eine umfassende Analyse der Chromatin-Struktur von S/MAR-Elementen *in vivo* steht noch aus.

### 1.2.2. Biologische Aktivität von S/MAR-Elementen

Als Verankerungspunkte der DNA in der Kernmatrix spielen die S/MAR-Elemente eine wichtige Rolle bei der strukturellen Organisation des Chromatins. Die durch ihre Bindungseigenschaften aufgebauten Domänen sind topologisch unabhängige Bereiche. Veränderungen der Superhelizität breiten sich beispielsweise nicht über die Grenzen der Domänen hinaus aus (Zehnbaumer und Vogelstein, 1986). Die Fähigkeit zum Auffangen topologischer Veränderungen wird mit der hohen Tendenz zur Strangtrennung in diesen Elementen erklärt. Sie könnte ein wichtiger Faktor in Transkriptionsprozessen sein, bei denen während des Fortschreitens der Polymerase eine Welle positiver Superhelizität erzeugt wird (Bode et al., 1996 und 2000). Neben dem Einfluß auf die Zellkernarchitektur konnten in Transfektionsexperimenten für verschiedene S/MARs trans-

kriptionsfördernde Wirkung gezeigt werden (Stief et al., 1989; Klehr et al., 1991 und 1992; Seibler, 1999). Im Fall des IgH-Gens der Maus sind die beiden Enhancer flankierenden S/MARs sogar notwendig für die Aktivierung des Promotors (Jenuwein et al., 1997). Weitere Beispiele, bei denen S/MARs in unmittelbarer Nähe von Enhancern liegen, wurden von Gasser & Laemmli (1986) und Jarman & Higgs (1988) beschrieben. Die cis-agierende Eigenschaft der S/MAR-Elemente scheint sich jedoch von denen eines Enhancers zu unterscheiden, da anders als bei diesen eine Integration in das zelluläre Genom Voraussetzung für die beobachteten Effekte ist (Schübeler et al., 1996).

In anderen Veröffentlichungen wird eine determinierende Rolle der S/MARs für die Zelltyp-Spezifität der Expression bestimmter Gene gezeigt (Bomifer et al., 1994; McKnight et al. 1992). Eine weitere Funktion der S/MAR-Elemente, welche mit ihrer Lokalisierung an den Domänengrenzen verbunden ist, stellt die isolierende Wirkung für Vorgänge an den im Inneren der Domäne liegenden Gene dar. In Untersuchungen zur Expressionsstärke von Transgenen in Abhängigkeit vom Integrationsort konnte gezeigt werden, daß S/MARs eine Isolator-Funktion ausüben, indem sie die Einflüsse des umgebenden Chromatins auf die Transkription abschirmen (Namciu et al., 1997).

Die in den letzten Jahren durchgeführten Arbeiten zur Identifizierung und Analyse von eukaryontischen Replikationsstartpunkten zeigten, daß die Sequenzeigenschaften der bisher isolierten „Origins of Replication“ häufig mit denen von S/MAR-Elementen übereinstimmen. Nach einer Hypothese von Boulikas (1995 und 1996) kann ein Teil der S/MARs als Replikationsstartpunkte während der in der S-Phase ablaufenden Verdopplung des Genoms fungieren. So wurde sowohl in *Drosophila* als auch am DHFR-Locus des Hamsters eine Ko-Lokalisierung von „Ori“-Bereichen und S/MARs nachgewiesen (Amati und Gasser 1990; Dijkwel und Hamlin, 1995). Außerdem konnten Carri et al. (1986) zeigen, daß die „Origins of Replication“ ebenso wie die S/MARs permanent mit der Kernmatrix assoziiert sind.

### **1.2.3. Methoden zur Vorhersage von S/MAR-Elementen**

Die größer werdende Menge an Sequenzinformationen, die durch die weltweiten Sequenzierungsprojekte produziert werden, erfordert effektive Möglichkeiten für die Vorhersage von Genen sowie von strukturell und regulatorisch wirksamen Bereichen. Die vielfältigen Funktionen von S/MARs unterstreichen die Bedeutung dieser Elemente und verdeutlichen die Wichtigkeit einer schnellen Identifizierung neuer Regionen mit S/MAR-Charakter. Die Vorhersage der S/MARs anhand von Konsensussequenzen hat sich wegen fehlender Homologien als nicht praktikabel erwiesen. Daher stützt man sich in neueren Ansätzen auf die strukturellen Merkmale oder auf häufig auftretende Sequenzmotive. Die folgenden Kapitel geben einen Überblick über die vorhandenen Möglichkeiten zur Vorhersage der S/MAR-Elemente.

### 1.2.3.1. „Stress-Induced Duplex DNA Destabilization“ - Das SIDD-Profil

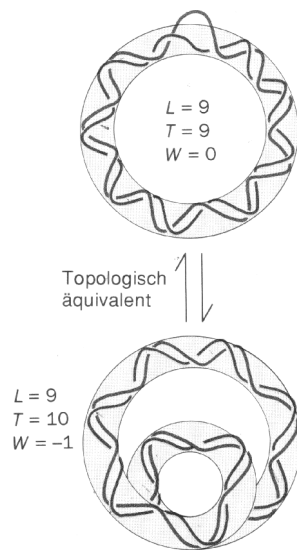
Die Bindung der S/MAR-Elemente an die Proteine der Kernmatrix ist das Hauptkriterium für ihre biochemische Identifizierung. Dabei scheint die Erkennung spezifischer Strukturmerkmale von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Tendenz zur Strangtrennung in diesen Bereichen hat sich als ein wichtiger Parameter herausgestellt. Einzelsträngigkeit in S/MARs wurde von Bode et al. (1992) *in vitro* nachgewiesen und ihre Bedeutung für die Matrixbindung anhand von Mutationsexperimenten demonstriert. 1997 wurde eine von Benham et al. entwickelte statistische Analyse vorgestellt, die der Berechnung der Stabilität der Doppelhelix-Bindung dient. Grundlage für die Berechnungen ist die Eigenschaft der DNA, sich unter negativer superhelikaler Spannung an Stellen mit der stärksten Instabilität der Basenpaarung zu öffnen. Um die Eigenschaften superhelikaler DNA besser zu verstehen, sollen im Folgenden kurz die Grundlagen der DNA-Topologie dargestellt werden.

### Superhelizität von DNA-Molekülen

Die Topologie eines doppelsträngiges DNA-Moleküls, welches an beiden Enden kovalent geschlossen ist, wird durch die folgenden drei Parameter beschrieben (nach Voet und Voet, 1992):

1. Die „linking number“ oder Verwindungszahl (L) beschreibt die Anzahl der Windungen eines Stranges um den anderen. Sie ist konstant, solange beide Stränge intakt bleiben, egal ob das Molekül verdrillt oder verformt wird. Topoisomerasen sind Enzyme, die die Verwindungszahl verändern.
2. Die „twisting number“ oder helikale Windung (T) ist ein Maß für die Anzahl der vollständigen Umdrehungen eines DNA-Stranges um die Helix-Achse. Sie wird durch die Anzahl der Basenpaarungen pro Windung in einer gegebenen Konformation im Vergleich zu der Anzahl der Basenpaarungen pro Windung von B-DNA unter physiologischen Bedingungen beschrieben. Sie kann in einem geschlossenen Molekül verändert werden, wenn Bereiche mit Strangtrennung erzeugt werden oder verschwinden. Dann sind die vorhandenen Windungen des Doppelstranges auf kürzere oder längere Bereiche verteilt, was eine Änderung der Anzahl der Basenpaarungen pro Windung zur Folge hat.
3. Die „writhing number“ oder superhelikale Windung (W) ist ein Maß für die Superhelizität eines Moleküls. Sie gibt die Anzahl der Windungen der DNA-Doppelhelix um die Superhelix-Achse an. Bei Einführung einer helikalen Windung muß bei konstanter Windungszahl eine entsprechende entgegengesetzte, superhelikale Windung erfolgen und umgekehrt.

Alle natürlich vorkommenden, ringförmigen DNA-Moleküle sind unterdreht, d.h. sie liegen unter negativer superhelikaler Spannung vor. Werden negativ superhelikale, verdrillte Moleküle in die zirkuläre Form überführt (siehe Abb.1.1) wird negative Superhelizität herausgenommen (W: -1



**Abb.1.1:** Topologisch äquivalente ringförmige DNA-Moleküle. Beide Formen sind ineinander überführbar, ohne, daß eine kovalente Bindung zu öffnen ist. Bei Einführung einer superhelikalen Windung  $W$  ändert sich die helikale Windung  $T$  um den entsprechenden entgegengesetzten Wert. (Nach Voet und Voet)

0). Als Konsequenz muß die helikale Windung verringert werden ( $T: 10 \rightarrow 9$ ), indem einzelsträngige Bereiche ausgebildet werden. Die Strangtrennung erfolgt an den Abschnitten mit der geringsten Stabilität der Basenpaarung. Diese Bereiche werden als destabilisierte Region bezeichnet.

In eukaryontischen Zellen spielt die Superhelizität der DNA eine Rolle bei Transkriptionsprozessen. Durch das Voranschreiten der RNA-Polymerase während der Elongation wird eine Welle positiver Superhelizität vor der Transkriptionsmaschinerie und negative superhelikale Spannung dahinter erzeugt (Liu und Wang, 1987, Tsao et al., 1989).

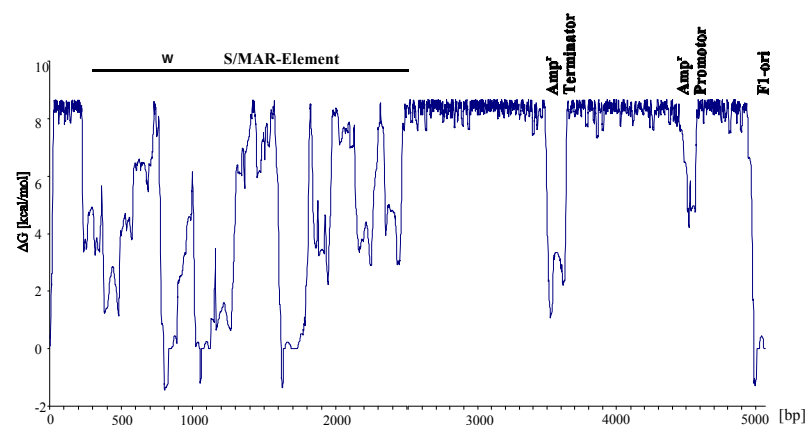
Dieses Phänomen wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert. Die Transkriptionsrate nach Transfektion von linearen Molekülen liegt deutlich unter der zirkulärer Ausgangs-DNA (Weintraub et al., 1986). Nach der Injektion in *Xenopus* Oozyten werden lineare Moleküle gar nicht transkribiert (Harland und Weintraub, 1983). Dunaway und Ostrander konnten 1993 zudem zeigen, daß die durch die Transkription eines Gens erzeugte lokale Superhelizität

ausreicht, um an einem benachbarten Promotor Transkriptionsinitiation in *Xenopus* Oozyten zu ermöglichen. Die angeführten Beispiele demonstrieren die Bedeutung der DNA-Topologie für die Transkription eukaryontischer Gene. Die S/MAR-Elemente als Verankerungspunkte der DNA an der Kernmatrix scheinen die Ausbreitungsgrenze der topologischen Veränderungen während dieser Vorgänge zu sein. Der Nachweis von Strangtrennung *in vitro* durch Bode et al. (1992) und die häufige Lokalisierung von Topoisomerase II-Aktivität an oder in der Nähe dieser Elemente ist eine Hinweis auf ihre Bedeutung bei der Regulation der DNA-Superhelizität *in vivo*.

Das SIDD-Profil berechnet die Stabilität der DNA-Doppelhelix und ermöglicht die Identifizierung jener Stellen, die bei Einführung negativer Superhelizität, zu Strangtrennung neigen. Überprüft wurde diese Methode durch Berechnung der einzelsträngigen Regionen in pBR322-Plasmiden (Benham 1993). In diesem Vektor war für die Bereiche des Ampicillin-Promotors und -Terminators von Kowalski et al. (1988) Sensitivität für die einzelstrangspezifische S1-Nuklease nachgewiesen worden. Benham gelang eine Berechnung der Position der Einzelsträngigkeit. Die Berechnungen des Profils basieren nicht nur auf den Bindungsenthalpien der einzelnen Basenpaarungen, sondern beziehen auch den Einfluß benachbarter Sequenzen ein. In S/MAR-Elementen konnte eine breite Destabilisierung nachgewiesen werden. In einer Reihe von Experimenten wurde der Zusammenhang zwischen der Breite der destabilisierten Region

und der S/MAR-Bindungseigenschaft untersucht. So wurde durch Multimerisierung eines „core unwinding“-Elementes gezeigt, daß eine Mindestlänge der destabilisierten Sequenz notwendig ist, um Bindung an die Kernmatrix zu erreichen (Kay und Bode, 1994). Die in prokaryontischen Sequenzen vorhandenen instabilen Regionen z.B. in Promotoren, Terminator-Bereichen oder Replikationsstartpunkten sind zu kurz, um S/MAR-Charakteristika aufzuweisen. Abb.1.2 zeigt das SIDD-Profil eines Prototyp-Vektors, in den ein S/MAR-Fragment eingebaut wurde. In der Graphik ist die freie Enthalpie der Basenpaarbindung über die Sequenz darstellt. Die Enthalpie ist ein Maß dafür, wieviel Energie aufgewendet werden muß, um den Doppelstrang bei der zugrunde gelegten superhelikalen Dichte (zumeist -0,05) zu öffnen. Im größten Teil des Vektorrückgrates ist die Doppelhelix stabil, der Graph bewegt sich auf Hintergrundniveau von über 8 kcal/mol. An einzelnen Stellen, die mit regulatorischen Bereichen kolokalisieren, erscheinen destabilisierte Peaks. Innerhalb des S/MAR-Fragmentes ist die DNA-Doppelbindung über den gesamten Bereich instabil. Die Enthalpie erreicht sogar negative Werte, was bedeutet, daß die DNA an diesen Stellen ohne Zufuhr von Energie einzelsträngig vorliegt. Die Position, an der in Experimenten von Bode et al. (1992) das „core-unwinding“-Elemente nachgewiesen wurde, ist mit einem Stern gekennzeichnet. Sie liegt exakt an der Spitze eines destabilisierten Peaks.

Die Identifizierung breiter destabilisierter Regionen in neuen Sequenzen soll in Zukunft als Vorhersagemethode für S/MAR-Elemente dienen. Die Sammlung von Stabilitäts-Daten bereits



**Abb.1.2:** SIDD-Profil des pTZE20-Plasmids (nach Benham et al., 1997).

Die Kurve kennzeichnet die freie Energie, die für die Strangtrennung der DNA an einer bestimmten Sequenzposition aufgebracht werden muß. Je niedriger der Wert ist, umso leichter kommt es zur Ausbildung von Einzelsträngigkeit. Das Vektorrückgrat ist in den meisten Bereichen stabil, es treten nur kurze destabilisierte Regionen an regulatorischen Stellen auf. Das eingebaute S/MAR-Element (das EcoRI-Fragment E aus der IFN $\alpha$ -Domäne, vgl. Abb.1.4) ist über die gesamte Sequenz instabil. Das von Bode et al. (1992) identifizierte „core-unwinding“-Element, ein zentrales Sequenzmotiv, von dem die Strangtrennung ausgeht, ist mit einem Stern gekennzeichnet.



bekannter Elemente wird die Methode absichern und weitere Erkenntnisse zur Struktur der S/MARs liefern.

### 1.2.3.2. Der „MAR-Finder“

Ein weiterer Ansatz zur Vorhersage von S/MAR-Sequenzen stützt sich auf die Auswertung spezifischer Sequenzmotive. Das mathematische Modell des MAR-Finders wurde 1997 von Singh et al. veröffentlicht. Es basiert auf der Identifizierung von S/MAR-spezifischen Sequenzmotiven und auf der statistischen Auswertung der Häufigkeit ihres gemeinsamen Auftretens innerhalb eines DNA-Bereiches. Eine signifikante Häufung von S/MAR-Motiven läßt auf die Existenz eines S/MAR-Elementes schließen. Die folgenden Motive können in die Suche einbezogen werden:

- AT-„pattern“: Wiederholtes Auftreten von AT-reichen Abschnitten ist besonders beachtenswert, aber auch der AT-Gehalt im Vergleich zu anderen, zufällig gewählten Sequenzen wird berechnet.
- TG-Reichtum: Einige S/MARs wurden durch TG-reiche Abschnitte charakterisiert (Boulikas, 1993). Diese Klasse der S/MAR-Elemente findet man häufig in 3'UTRs von Genen.
- ATTA-, ATTTA- oder ATTTTA-Motive: Boulikas (1993) konnte zeigen, daß S/MARs, „origins of replication“ und Erkennungs- und Bindungsstellen von homeotischen Proteinen reich an diesen Sequenzmotiven sind.
- „curved“ DNA: An oder nahe von S/MAR-Elementen wurden häufig Sequenzmotive nachgewiesen, die zu einer gebogenen DNA-Konformation führen. Optimales „curving“ ist für AAAAn<sub>7</sub>AAA<sub>n</sub>AAAA- oder TTATAA-Bereiche zu erwarten. (Boulikas, 1993)
- „kinked“ DNA: Diese Bereiche stellen besonders starke Biegungen im DNA-Strang dar. Sie entstehen beim Auftreten von mehreren Kopien der Dinukleotide TG, CA oder TA in Abständen von 2 bis 4 oder 9 bis 12 Basenpaaren (Trifonov, 1986; McNamara et al., 1990).
- TopoisomeraseII-Schnittstellen: Wie in Kapitel 1.1 bereits beschrieben, wurden TopoisomeraseII-Konsensussequenzen gehäuft in S/MARs nachgewiesen.
- ATC-Motiv: Bereiche, in denen über mehr als 20 bp nur A-, T-, oder C-Nukleotide vorkommen (Nakagomi et al., 1994).
- „Konsensus“-Motiv: TCTTTAATTTCTAATATATTTAGAA

Das von Bode et al. (1992) im IgH-Gen assoziierten S/MAR gefundene Motiv ist das „core unwinding“-Element, von dem die Strangtrennung des Bereiches ausgeht. Es ist immer mit einem S/MAR verbunden, ist jedoch nicht in allen S/MARs zwangsläufig enthalten.

Die aufgelisteten Sequenzmotive können wahlweise in die S/MAR-Suche einbezogen werden. Das Ergebnis ist eine graphische Darstellung ähnlich der des SIDD-Profiles, in der das Matrix-Bindungspotential über die Sequenz aufgetragen ist. Das MAR-Finder-Programm bietet den

Vorteil einer freien Zugänglichkeit im Internet. Die Analyse kann mittlerweile an Sequenzen von bis zu 100 kbp durchgeführt werden und dauert im allgemeinen nicht länger als einige Minuten. Ein Vergleich der SIDD-Profile verschiedener Sequenzen mit den berechneten Bindungspotentialen des MAR-Finders ergab in vielen Fällen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden.

### 1.2.3.3. Der S/MAR-Test (Genomatix)

Eine dritte Methode zur Vorhersage AT-reicher S/MARs bietet das Programm *S/MARTest* der Firma Genomatix. Es basiert auf der Datenbank experimentell bestimmter S/MARs der AG Bioinformatik der GBF Braunschweig (S/MARt DB). Aus den dort vorhandenen S/MAR-Sequenzen wird eine wachsende „S/MAR-Matrix-Datenbank“ erstellt, die Informationen zur Nukleotidverteilung der durch eine „Alignment“ ausgerichteten S/MARs enthält. Durch den Vergleich der Nukleotidverteilung der zu testenden Sequenz mit dieser Matrix-Datenbank wird die Wahrscheinlichkeit für die Zugehörigkeit zur AT-reichen S/MAR-Klasse bestimmt.

Ein Nachteil dieses Programms liegt im Fehlen graphischer Darstellungen zur Veranschaulichung der Ergebnisse.

## 1.3. Interferone von Typ I und ihre biologische Aktivität

Interferone (IFN) sind Cytokine, die ursprünglich definiert wurden durch ihre Fähigkeit, in Zellen einen antiviralen Status zu induzieren. Sie werden in zwei Gruppen (Typ I und II) unterteilt (Isaacs und Lindenman, 1957). Das zum Typ II gehörende IFN- $\alpha$  wurde ausschließlich in Mammalia beschrieben und wird durch ein einziges Intron-haltiges Gen kodiert. Es unterscheidet sich vor allem durch seine biochemischen Eigenschaften, z.B. Labilität gegenüber Säurebehandlung, von den Interferonen vom Typ I. Diese werden in Säugern in fünf Subtypen, basierend auf Primärstruktur und antigenischer Kreuzreaktivität, eingeteilt: IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ; IFN- $\delta$  sowie IFN- $\epsilon$ . Die im humanen Genom gefundenen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -IFN-Gene sollen im Mittelpunkt dieses Kapitels stehen.

### 1.3.1. Der humane Typ I Interferon-Gencluster

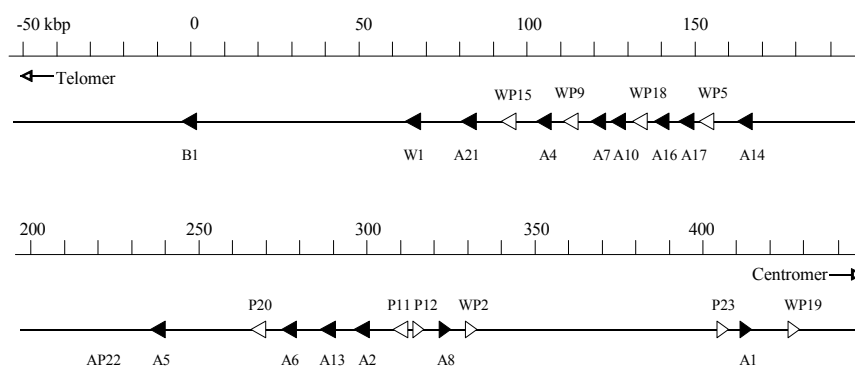
Die Gene der Interferone von Typ I sind im menschlichen Genom in einem Gencluster auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (p21-22) lokalisiert. Sie gehören neben den Histon-Genen zu den wenigen Beispielen Intron-loser Gene. Der Gencluster umfaßt 15 Gene und 11 Pseudogene. Die 20 distal liegenden Gene sind tandemartig hintereinander angeordnet und weisen mit ihren 3'Ende zum Telomer. Die proximal liegende Gruppe zeigt umgekehrte Orientierung, was neben den zahlreichen Duplikationsrunden während der evolutionären Entwicklung des Clusters auf ein Inversionssereignis schließen läßt (Übersicht in Roberts et al., 1998).

Die Gruppe der  $\alpha$ -IFN-Gene zählt 13 funktionelle Mitglieder, von denen die meisten in zwei größeren Teilgruppen angeordnet sind. Die distal liegende Gruppe weist größere Homologien auf und wird daher auf einen relativ späten Entstehungszeitpunkt datiert.

Das einzige  $\beta$ -IFN-Gen liegt am distalen Ende des Clusters und ist durch eine noch 50%ige Homologie zu den  $\alpha$ -Interferonen gekennzeichnet.

Die Gruppe der  $\omega$ -IFN-Gene, die früher als  $\alpha$ II-Gene bezeichnet wurde, hat nur noch einen funktionellen Vertreter - das IFN  $\omega$  1 - der proximal von  $\beta$ -IFN-Gen liegt.

Die 11 Pseudogene gehen z.T. auf die  $\omega$ -Subfamilie zurück. Es gibt aber auch einige nicht funktionelle Gene, deren Ursprung nicht mehr bestimmbar ist. Die Analysen zur Anordnung der Typ I-Interferon-Gene im Gencluster gehen auf die Arbeiten von Diaz et al. (1994) zurück. Abb.1.3. zeigt die schematische Struktur dieses Chromosom-Bereiches. Zwischen allen Genen des Clusters konnten durch „Halo-Mappierung“ S/MAR-Elemente lokalisiert werden (Strissel et al., 1998). Es sind jedoch keine Informationen über die präzisen Grenzen der einzelnen Elemente bekannt. Es konnte aber die Tendenz beobachtet werden, daß neben funktionellen Genen S/MARs mit starker Bindung und neben Pseudogenen Elemente mit schwachen Bindungseigenschaften lokalisiert sind. Dies könnte ein Hinweis sein, daß der Erhalt einer funktionellen Gendomäne in der Evolution Konsequenzen für die evolutive Entwicklung der S/MARs hat. Weitere Erkenntnisse werden Homologievergleiche der Elemente des Clusters liefern.



**Abb.1.3:** Der humane Interferon Typ I-Gencluster auf Chromosom 9 p21-22

Die Interferongene sind durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet, weiße Dreiecke symbolisieren die Pseudogene (nach Diaz et al., 1994).

### 1.3.2. Die biologische Funktion der Typ-I Interferone

Ihre biologische Wirkung entfalten die Interferone nach Bindung an den Typ I- bzw. Typ II-spezifischen Rezeptor. Die dadurch verursachte Heterodimerisierung zweier Polypeptidketten führt zur Bildung des funktionellen, die Signalkaskade einleitenden Rezeptormoleküls (Lewerenz et al., 1998).

Im allgemeinen kann man drei Hauptaktivitäten der Interferone beobachten. Die anti-proliferative Wirkung resultiert aus einer Verlangsamung des Zellzyklus. Zusätzlich führt die Applikation von Interferon in vielen Fällen zur Apoptose-Induktion. Beide Effekte machen einen großen Teil der antitumorigenen Wirkung aus. Zudem sind Interferone in der Lage, die Replikation vieler Viren zu inhibieren und dadurch antivirale Aktivität zu entfalten. Bei diesem Vorgang spielt die Hemmung des zellulären Translationsapparates eine wichtige Rolle. Zusätzlich kommt es zu Veränderungen der Infektionskompetenz der Viren, die einer weitere Ausbreitung auf andere Zellen eindämmen. Die zahlreichen immunmodulatorischen Aktivitäten sind Objekt intensiver Untersuchungen immunbiologischer Forschungsgruppen. Interferone spielen z.B. bei der Differenzierung spezifischer Zellen des Immunsystems eine Rolle. Außerdem sind sie an der Regulation der Expression der MHC-Komplexe beteiligt.

Die Produktion der Interferone erfolgt am Ort ihrer Wirkung, wo sie auto- bzw. parakrine Effekte auf die sekretierende Zelle oder auf deren Nachbarn entfalten. Wegen ihrer vielfältigen Wirkungen unterliegt die IFN-Synthese einer strikten Regulation. Im Normalfall werden die Interferongene nicht exprimiert. Erst nach Induktion, z.B. durch Viren, doppelsträngige RNA, LPS oder verschiedene Cytokine, kommt es zu einer schnellen Aktivierung der Genexpression. Die dabei ablaufenden Signalkaskaden sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, daß einige IFN-Gene zuerst induziert werden und diese dann in einer Art „feed-back“ Schleife ihre eigene Expression und die anderer IFN-Subtypen beeinflussen (Bode und Hauser, 1990; Marie, 1998).

### 1.3.3. Die humane Interferon- $\alpha$ -Domäne

Die humane IFN- $\alpha$ -Domäne wird durch 5' und 3' liegende S/MAR-Elemente begrenzt. Das IFN- $\alpha$ -Gen liegt innerhalb der Chromatinschleife. In frühen Untersuchungen der Domäne wurden die EcoRI-Fragmente nach ihrer Größe mit Buchstaben bezeichnet. Diese Nomenklatur wurde in späteren Veröffentlichungen beibehalten und wird daher auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Bindungseigenschaften der S/MARs wurden von Mielke et al. (1990) charakterisiert. Die Autoren konnten in Reassoziationsexperimenten zeigen, daß die als „I“, „E“ und „H“ bezeichneten EcoRI-Fragmente des 5' S/MARs mit 85-100% Bindungskapazität sehr stark mit der Kernmatrix assoziieren und das „C“-Fragment mittelstarke Bindung aufweist.

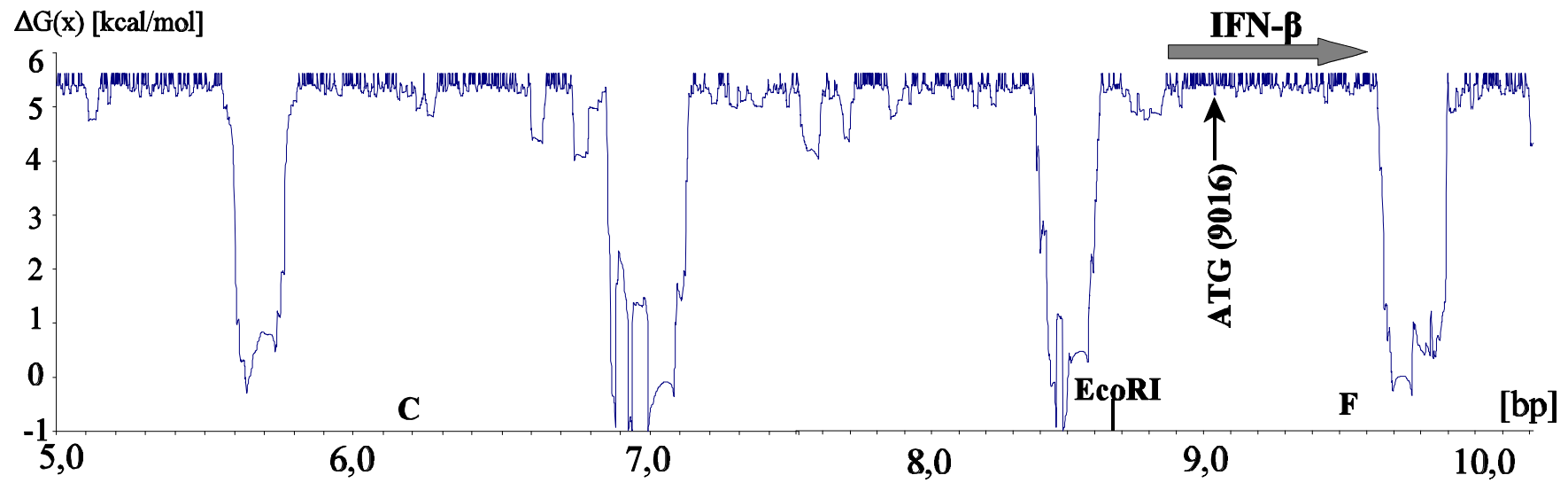
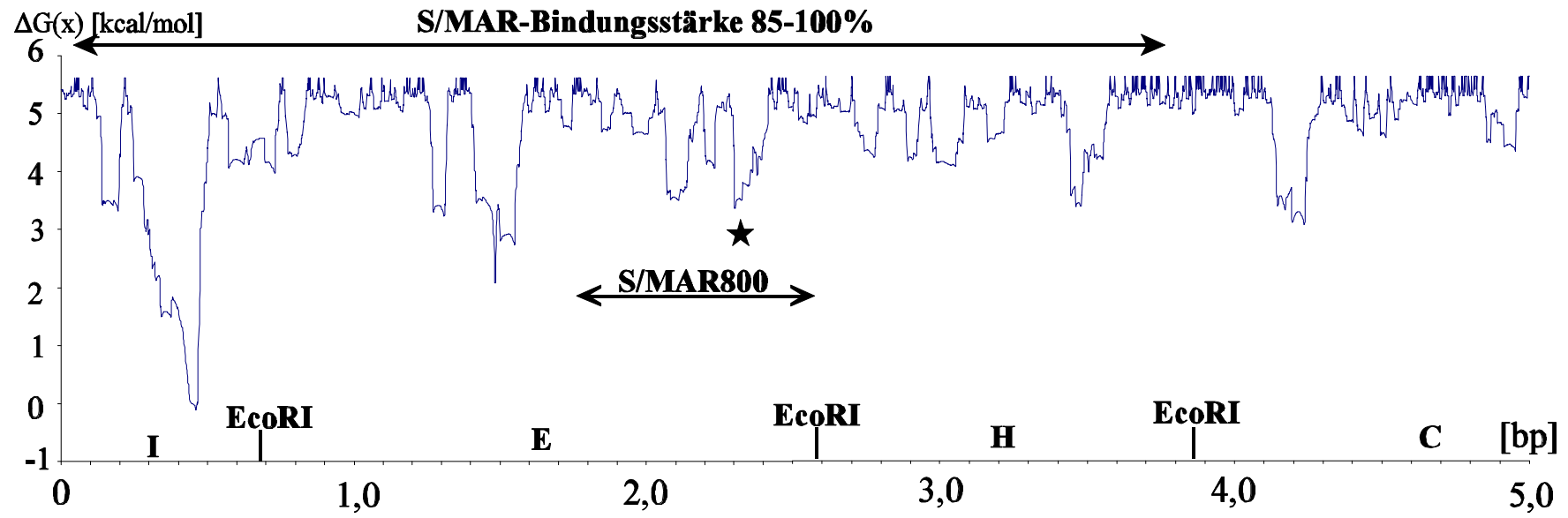
Der für die vollständige Induktion des Gens durch Virusinfektion notwendige Bereich des IFN-

â-Promotor liegt zwischen -110 und -36 vom Transkriptionsstartpunkt und wird als „Virus Responsive Element“ (VRE) bezeichnet.

In Abb.1.4 ist die SIDD-Kalkulation des 5'Bereiches der Domäne dargestellt. Der kodierende Bereich des IFN-â-Gens ist sehr stabil, Promotor und PolyA-Region weisen Destabilisierungen auf. Die Positionen der EcoRI-Schnittstellen sind eingetragen, ebenso die Bezeichnung der EcoRI-Fragmente. Die Fragmente I, E und H weisen deutliche Destabilisierung über die gesamte Sequenz auf. Im C-Fragment findet man nur noch lokal destabilisierte Abschnitte. Besonders die Peaks bei 5600, 7000 und 8500 fallen dabei ins Auge. Das bei Mielke et al. (1990) untersuchte und häufig zitierte S/MAR800 ist ein Teilfragment des EcoRI-Fragmentes „E“. Das von Bode et al. (1992) nachgewiesenen „core unwinding“-Element, welches für die Strangöffnung im S/MAR800 verantwortlich ist, wurde wie zuvor in Abb.1.2 mit einem Stern gekennzeichnet.

**Abb.1.4:** SIDD-Profil des 5'Bereiches der IFNâ-Domäne

In der Graphik ist die „freie Energie“ der Basenpaarung gegen die Sequenz aufgetragen. Je niedriger die Werte sind, umso leichter kommt es zur Strangtrennung. Die Positionen der EcoRI-Schnittstellen und die Bezeichnungen der resultierenden Fragmente sind eingetragen. Ebenso ist die Lage des Interferon-â-Gens gekennzeichnet. Das S/MAR800 ist ein Teil des E-Fragmentes. Es weist neben dem I-, E- und H-Fragmenten sehr starke Bindungseigenschaften auf (Mielke et al., 1990) und war Hauptuntersuchungsobjekt der Strukturanalysen von Bode et al. (1992). Das bei diesen Untersuchungen identifizierte „core unwinding“-Element mit der Sequenz TAATATATTT, welches maßgeblich zur Strangtrennung des Bereiches beiträgt, liegt an der Spitze eines destabilisierten Peaks (i). Ein gleiches Motiv wurde als Initiationssequenz für die Strangtrennung im IgH Enhancer-S/MAR identifiziert (Kohwi-Shigematsu und Kohwi, 1990). Der pTZ18R-Vektor, in den das S/MAR800-Fragment eingebaut wurde, heißt pCI und ist in vielen Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendet worden. Das Plasmid, welches das gesamte E-Fragment (allerdings in reverser Orientierung) trägt, heißt pTZE20.



#### 1.4. Aufgabenstellung

S/MARs sind wichtige Strukturelemente, die bei der Organisation des Chromatins im Zellkern eukaryontischer Organismen eine wesentliche Rolle spielen. Ihre Funktion ist eng mit ihren strukturellen Eigenschaften verbunden. Das SIDD-Vorhersageprogramm für diese Elemente stützt sich auf die Berechnungen dieser Eigenschaften.

In der vorliegenden Arbeit sollen Methoden etabliert werden, mit denen eine Feinanalyse der Chromatinstruktur auf breiter Ebene durchgeführt werden kann. Besonderes Augenmerk liegt auf der Untersuchung des Strangtrennungspotentials der S/MARs. Zu Beginn erfolgt eine *in vitro*-Analyse von in Plasmiden eingebauten S/MAR-Elementen und der Abgleich der Ergebnisse mit dem SIDD-Profil dieser Moleküle. Daran anschließend soll die Untersuchung der Chromatinstruktur einer genomischen Domäne *in vivo* beschrieben werden. Die DNA-Konformation des S/MAR-Elementes an der Grenze der Gendomäne und auch die Struktur der DNA im Schlaufenbereich der Domäne wird mit Hilfe verschiedener einzelstrangspezifischer Reagenzien untersucht und mit den *in vitro*-Analysen korreliert. Außerdem stehen Untersuchungen zur DNase I-Sensitivität und die Lokalisierung von Topoisomerase II-Schnittstellen im Mittelpunkt. Die Gesamtheit der gesammelten Informationen aus diesen Strukturanalysen soll mit dem von C. Benham berechneten SIDD-Profil verglichen werden, um eine Einschätzung des Potentials dieses Programms bei der Vorhersage von S/MAR-Elementen vornehmen zu können. Die Ergebnisse werden helfen, die Vorstellungen von der Organisation des eukaryontischen Chromatins zu verbessern und Einblicke in die strukturellen Voraussetzungen funktioneller S/MAR-Elemente zu ermöglichen.

In einem zweiten Teil soll die Beteiligung an der Vorbereitung der Sequenzierarbeiten des humanen Typ I Interferon-Genclusters auf Chromosom 9 p21-22 beschrieben werden. Dabei steht die Auswahl und Analyse geeigneter Klone für die Erstellung einer physikalischen Karte dieser Region im Vordergrund. Die Untersuchungen leiten weitere Forschungsvorhaben ein, die thematisch eng mit der vorliegenden Arbeit verbunden sind.

## 2. Ergebnisse

Nach dem Domänenmodell ist das Chromatin einer eukaryontischen Zelle in einer Art Schlaufenstruktur organisiert, wobei die S/MAR-Elemente die Anheftungspunkte der DNA an die Kernmatrix darstellen und die Gene innerhalb der DNA-Schleife lokalisiert sind (Gasser und Laemmli, 1987; Vodelstein et al., 1980). Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der 5' und 3' vom IFN $\alpha$ -Gen gelegenen S/MAR-Elemente, die die Grenzen der IFN $\alpha$ -Domäne markieren, sind durch eine Reihe von Untersuchungen näher charakterisiert worden (Bode und Maass, 1988; Klehr et al., 1991; Mielke et al., 1990). Bei der Entwicklung eines Vorhersageprogramms für S/MAR-Elemente, welches auf der Berechnung der Stabilität der DNA-Doppelhelix basiert, wurde ein Teilfragment des 5'-S/MARs als Prototyp-Element herangezogen (Benham et al., 1997). Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand nun eine Feinanalyse der Chromatinstruktur der IFN $\alpha$ -Domäne. Ein wesentliches Ziel war der Abgleich der Struktur der DNA in dieser Domäne mit den Ergebnissen der von Benham et al. entwickelten Vorhersagemethode. Die Ergebnisse sollten außerdem zu einem besseren Verständnis der Funktion der S/MAR-Elemente bei der Organisation des chromosomalen Chromatins beitragen. Die Untersuchungen werden in Folge-Projekten auf einen größeren Bereich ausgedehnt. Der IFN-Gencluster, innerhalb dem auch die IFN $\alpha$ -Domäne liegt, ist dafür ein ideales Untersuchungsobjekt. Zwischen allen Genen dieses Clusters wurden von Strissel et al. (1998) S/MAR-Elemente identifiziert. Allerdings sind weder die Grenzen noch detaillierte Informationen zum Aufbau der gefundenen Elemente, ihrer Funktion, zu Sequenzhomologien u.ä. vorhanden. Eine Voraussetzung für weitergehende Forschungen auf diesem Gebiet ist die Kenntnis der gesamten Sequenz des Genclusters. In der vorgelegten Arbeit wird im zweiten Teil die Beteiligung an der Vorbereitung der Sequenzierungsarbeiten im Rahmen des HumanGenomProjektes dargelegt. Diese Arbeiten haben wesentlich dazu beigetragen, daß der humane IFN-Gencluster heute fast vollständig sequenziert ist.

### 2.1. Analyse der Chromatinstruktur der IFN $\alpha$ -Domäne unter Verwendung verschiedener „footprinting“-Methoden

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse von Experimenten zur Untersuchung höherer Strukturen in der IFN $\alpha$ -Domäne dargestellt. Ein erster Abschnitt beschreibt dabei die verwendeten Methoden, um die Vorgehensweise zu verdeutlichen. Es folgen Ergebnisse von *in vitro* Analysen an S/MAR-Elementen, die Informationen über die funktionsbestimmende Struktur dieser Elemente und die Korrelation mit vorhandenen Vorhersagemodellen liefern. Schließlich wird eine Reihe von Aspekten der Chromatinorganisation der Modelldomäne *in vivo* näher untersucht.



### 2.1.1. „footprinting“-Methoden zur Strukturanalyse der DNA

Hinter dem Begriff „footprinting“ verbirgt sich eine Reihe von Methoden, mit denen auf der Grundlage von Sequenzinformationen die strukturelle Organisation eines DNA-Abschnittes untersucht werden kann. Dabei werden verschiedene Aspekte wie Zugänglichkeit der DNA in Zusammenhang mit Proteinbindung, Einzelsträngigkeit oder Sekundärstruktur-Ausbildung in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Als Ergebnis der Gesamtheit aller dieser Methoden wird ein besseres Verständnis der Regulation eines DNA-Abschnittes auf der Basis der Kenntnisse struktureller Merkmale erwartet.

Die experimentelle Vorgehensweise bei der Untersuchung struktureller Merkmale ist in Abb.2.1A dargestellt. Bei der Verwendung von „footprinting“-Methoden nutzt man die Spezifität von Chemikalien oder Enzymen für besondere DNA-Konformationen oder -Eigenschaften. Zum Beispiel reagieren Kaliumpermanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) und Bromacetaldehyd (BAA) mit einzelsträngigen Nukleotiden innerhalb einer DNA-Sequenz ( $\text{KMnO}_4$  mit T-Nukleotiden und BAA mit C- und A-Nukleotiden). Die Nukleotide werden bei dieser Reaktion so verändert, daß eine Doppelstrang-Bildung nicht mehr möglich ist. Der einzelsträngige Zustand wird damit gewissermaßen eingefroren. Diese spezifische Veränderung oder Modifizierung der DNA kann sogar innerhalb einer lebenden Zelle durchgeführt und für den Nachweis einzelsträngiger Abschnitte genutzt werden. Nach der Isolierung wird die modifizierte DNA geschnitten. Dabei verwendet man die Chemikalie Piperidin, die die DNA ausschließlich an den durch  $\text{KMnO}_4$  oder BAA markierten, einzelsträngigen Nukleotiden schneidet. Ein Schema des Mechanismus der Modifikationsreaktionen ist in Abb.2.1.B dargestellt.

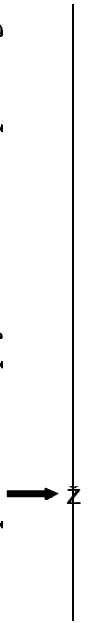
Die anschließende Lokalisierung der eingefügten Schnittstellen gibt Auskunft über die Position vorhandener einzelsträngiger DNA-Bereiche. Derartige sogenannte destabilisierte Sequenzen können *in vitro* auch durch die Verwendung der Einzelstrang-spezifischen S1-Nuklease geschnitten und nachgewiesen werden.

Die endonukleolytische DNase I benutzt man dagegen, um die Zugänglichkeit der DNA zu untersuchen. Ein Bereich, an den Proteine gebunden sind, ist vor DNase I-Abbau geschützt. Andere Regionen zeigen eine auffallend hohe Sensitivität für dieses Enzym. Solche Stellen werden als „DNaseI-hypersensitive sites“ (DNase-HS) bezeichnet. Es sind Bereiche mit einer besonders offenen Chromatinstruktur, die häufig von regulatorischer Bedeutung sind. Oft stellen die DNase-HS aber auch Abschnitte unter Torsionsspannung dar. Bei hinreichend geringer Konzentration an DNase I und kurzen Reaktionszeiten werden zuerst diese Stellen geschnitten. Die Lokalisierung der Schnittstellen gibt Auskunft über die Position möglicher regulationsrelevanter Bereiche.

Die Chemikalie VP16 wird verwendet, um die Stellen zu lokalisieren, an denen Topoisomerase II aktiv ist. Das Reagenz bindet spezifisch an den DNA-Enzym-Komplex und inhibiert das

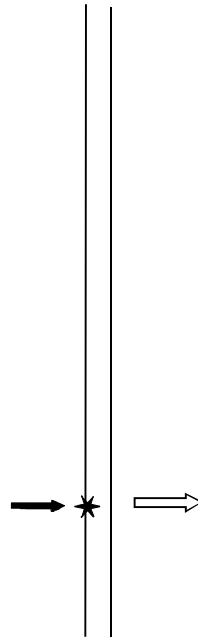
### Besonderes strukturelles Merkmal innerhalb der DNA z.B.:

- Einzelsträngigkeit
- freie Zugänglichkeit
- Schutz durch Proteinbindung
- Sekundärstruktur
- Bruchpunkte durch physikalische Beanspruchung oder Enzymaktivität

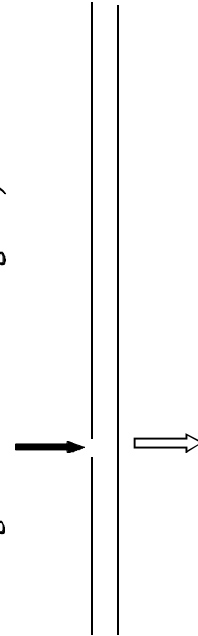


### Markierung des strukturellen Merkmals durch:

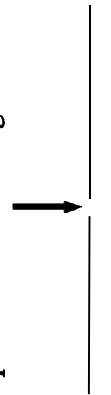
- Reaktion mit Chemikalien mit Spezifität für dieses Merkmal (BAA,  $\text{KMnO}_4$  reagieren so mit einzelsträngigen Nukleotiden, daß keine Doppelstrangbildung mehr möglich ist)



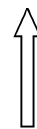
- Einführung eines Einzelstrang-oder Doppelstrangbruches durch spezifische enzymatische Aktivität (S1-Nuklease schneidet einzelsträngige DNA z.B. in Haarnadelstrukturen; DNase I schneidet zuerst die zugänglichen, ungeschützten DNA Bereiche) oder Inhibitoren von Ligationsereignissen (VP16 inhibiert Topoisomerase II nach Einführung des Strangbruches - vor der Religation)



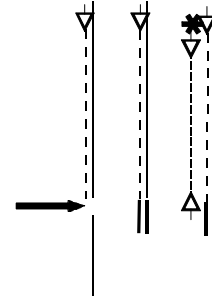
Reaktion der markierten einzelsträngigen Nukleotide mit Piperidin führt zu Strangbruch



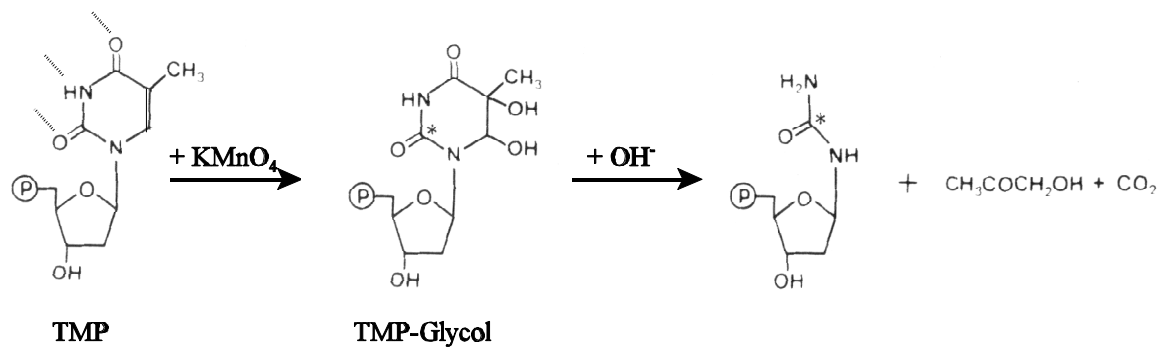
**Nachweis des Strangbruches durch:**  
Southern Blot nach Restriktionsverdau;  
Hybridisierung mit endständiger Sonde  
(Indirekte Endmarkierung)



LM-PCR  
Primer Extension  
Linker-Ligation  
PCR mit markiertem Primer



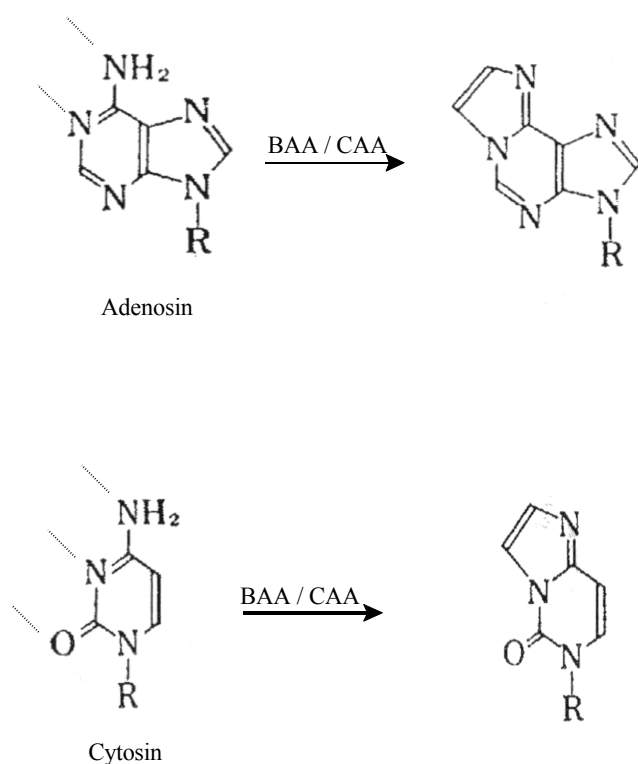
**Abb.2.1A:** Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise zum Nachweis struktureller Besonderheiten innerhalb eines DNA-Bereiches. (Nähere Erläuterungen im Text)



**Abb.2.1B:** Reaktionsmechanismen der „footprinting“-Reagenzien.

$\text{KMnO}_4$  reagiert mit Thymidin-Basen zu einem Diglycol. Die reagierenden Stellen des Moleküls sind in doppelsträngiger DNA-Form nicht genügend exponiert, um eine Reaktion zu ermöglichen. In einzelsträngiger DNA ist die dreidimensionale Struktur des Moleküls so verändert, daß eine Reaktion möglich ist. Die Bildung des Glycols verhindert die erneute Ausbildung der Basenpaarung. Brom- und Chloracetaldehyd reagieren an den doppelstrangbildenden Positionen in Adenosin- und Cytosinresten, die nur in einzelsträngiger DNA für die Reaktion zugänglich sind. Durch die Reaktion wird ein neues Ringsystem gebildet, welches erneute Basenpaarung verhindert (Kayasuga-Mikado et al., 1980).

Alle gezeigten Modifikationsereignisse führen zu einer Veränderung der Struktur der Basen, die einen Bruch zwischen Base und Zucker in einer zweiten Reaktion mit Piperidin ermöglicht. In allen Fällen katalysiert Piperidin auch die  $\beta$ -Eliminierung der Phosphatreste vom freien Zucker und bewirkt so eine endgültige Spaltung des DNA-Stranges (Maxam und Gilbert, 1980). Eine andere Möglichkeit der Spaltung der modifizierten Thymidin-Base nach  $\text{KMnO}_4$ -Modifikation ist im oberen Teil der Abbildung demonstriert. Die Behandlung mit Alkali ( $\text{NaOH}$ ) resultiert ebenfalls in einer Spaltung der Base unter Bildung von Deoxyribosylurea Monophosphat (DRUP) (Ide et al., 1985).



Enzym nachdem ein Doppelstrangbruch eingefügt wurde. Die Re-Ligation wird verhindert. Im „footprinting“-Experiment bestimmt man die Position der eingeführten Strangbrüche.

Eine grobe Lokalisierung der Position der eingeführten Schnittstellen kann im Southern-Blot erfolgen. Hierfür wird die DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten, die entstehenden Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Größe der Fragmente wird durch den Abstand der Restriktionsschnittstelle zum nächstgelegenen Strangbruch, eingefügt durch eine der oben beschriebenen Modifizierungen, bestimmt. Mittels einer radioaktiv-markierten Sonde, die direkt an die Sequenz neben der Restriktionsstelle bindet, wird die Größe der Fragmente in der zu untersuchenden Region ermittelt und daraus die Position des nachzuweisenden Strukturmerkmals berechnet (indirekte Endmarkierung). In Fällen, in denen die Modifizierung zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt (DNaseI oder VP16) kann ein herkömmlicher Southern-Blot durchgeführt werden. Werden nur Einzelstrangbrüche eingefügt (S1-Nuklease) oder liegt die DNA wie nach der Behandlung mit Piperidin irreversibel denaturiert vor, so muß die Auftrennung der Fragmente mittels einer denaturierenden Gelelektrophorese erfolgen. Dies ist für *in vitro*-Analysen an Plasmid-DNA sehr erfolgreich gelungen. Eine Anwendung an genomischer DNA hat sich allerdings als ungeeignet erwiesen.

Die indirekte Endmarkierung zur Bestimmung der Position einer Modifizierungsstelle ergibt einen guten Überblick über die Struktur eines größeren DNA-Bereiches. Sie ist besonders bei der Lokalisierung von DNase I- und Topoisomerase II-Schnittstellen die Methode mit der größten Aussagekraft.

Ein noch detaillierteres Bild über die Struktur einer untersuchten Region liefert die „Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction“ (LM-PCR). Diese besondere Form der PCR erlaubt den Nachweis von Schnittstellen mit Einzelnukleotid-Auflösung. Dabei wird in einer „Primer-Extension“-Reaktion an denaturierter DNA, ausgehend von einer bekannten Primerbindungsstelle, der zweite DNA-Strang bis hin zum zu lokalisierenden Strangbruch synthetisiert. An das entstehende „blunt“ Ende wird ein Linker bekannter Sequenz ligiert. Das entstandene Fragment kann nun durch herkömmliche PCR amplifiziert, die Größe nach Auftrennung im Sequenziergel bestimmt und daraus die Position der ursprünglichen Modifizierungsstelle ermittelt werden. In den veröffentlichten PCR-Protokollen (Mueller und Wold, 1989; Hershkovitz und Riggs, 1997) wird stets eine radioaktive Markierung der nachzuweisenden Fragmente verwendet. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine nichtradioaktive Variante dieser Methode unter Verwendung Digoxigenin-markierter Primer etabliert. Außerdem wurden verschiedene Polymerase-Enzyme in den Amplifikationsreaktionen getestet, um die Versuchsbedingungen zu optimieren. Ein Schema des Versuchsablaufes und ein detailliertes Protokoll finden sich gemeinsam mit diversen Hinweisen zur Durchführung in Kapitel 4.7.2. (Material und Methoden).

### 2.1.2. Untersuchung der Eigenschaften von S/MAR-Elementen *in vitro*

S/MARs sind DNA-Struktur-Elemente, die wesentlich zur Chromatinorganisation beitragen. Ihre Bindung an Proteine der Kernmatrix ist eng mit einer hohen Tendenz zur Ausbildung einzelsträngiger Bereiche korreliert (Bode et al., 1992). Eine Identifizierung dieser Elemente war bisher, aufgrund fehlender Konsensussequenzen, nur durch biochemische Bindungsanalysen möglich. Mit der Entwicklung des SIDD-Profiles, einer Methode zur Berechnung der Doppelstrang-Stabilität der DNA-Helix, eröffnete sich eine Möglichkeit der Vorhersage von S/MAR-Elementen (Benham et al., 1997; Bode et al., 2000). Die im folgenden Kapitel beschriebenen Experimente sollten einer Überprüfung der im SIDD-Profil vorhergesagten Einzelstrangbildung an Modell-Elementen *in vitro* dienen, um ihre besonderen Strukturcharakteristika näher zu analysieren und um die Leistungsfähigkeit des SIDD-Programms besser einschätzen zu können.

Aufbauend auf den Experimenten von Kowalski et al. (1988), die eine Öffnung des DNA-Doppelstranges von Plasmiden unter superhelikaler Spannung im Bereich des Ampicillin-Promotors, Terminators und im Replikationsstartpunkt zeigen konnten, sollte untersucht werden, ob auch in Fragmenten mit S/MAR-Bindungseigenschaften Strangtrennung auftritt:

Nach den Vorhersagen des SIDD-Profiles ist die DNA in den von Kowalski und Kollegen untersuchten Bereichen lokal stark destabilisiert, was eine Aufschmelzung der DNA-Doppelhelix begünstigt. Wird zusätzlich ein S/MAR-Element in diese Vektoren eingebaut, geht die Destabilisierung in den oben genannten Bereichen zurück. Die wahrscheinlichste Region für die Strangtrennung verlagert sich dann in das S/MAR-Insert.

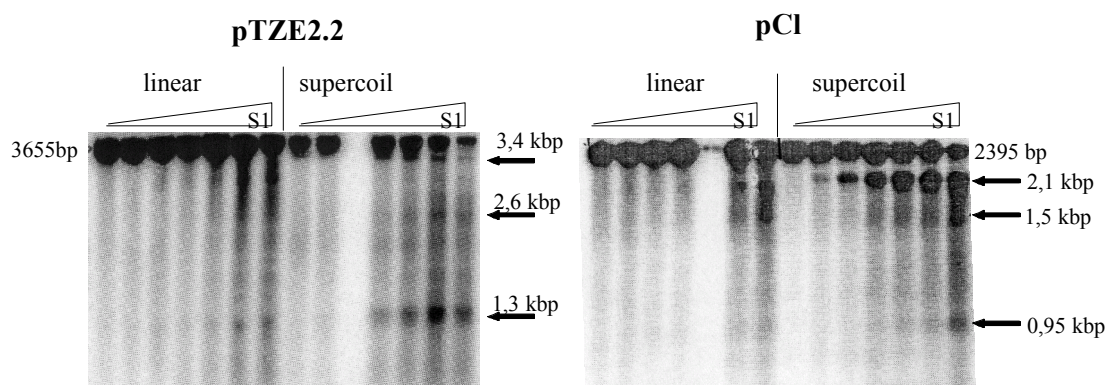
Unter Kenntnis dieser Ergebnisse wurden superhelikale Plasmide als Positivkontrolle für die Etablierung der Methoden zum Nachweis der Einzelsträngigkeit verwendet. Da die Superhelizität und damit auch die Destabilisierung durch eine Linearisierung des Plasmids aufgelöst wird, stand auch eine entsprechende Negativkontrolle zur Verfügung. Der experimentelle Nachweis des Einzelstrangcharakters sollte mittels S1 Nuklease-„footprinting“ erfolgen. S1 Nuklease ist ein Enzym mit endonukleolytischer Aktivität, deren Spezifität stark von pH-Wert und Ionstärke abhängig ist. Bei optimal eingestellten Pufferbedingungen weist sie eine hohe Spezifität für einzelsträngige DNA auf.

Die Untersuchungen wurden parallel an zwei Plasmiden vorgenommen. Das pCI-Plasmid ist ein Derivat des kommerziellen Vektors pTZ18R (Pharmacia), in den das „S/MAR800“-Fragment aus der IFN $\alpha$ -Domäne eingebaut wurde (siehe Einleitung Abb. 1.4). Das pTZE2.2-Plasmid trägt als Insert ein S/MAR-Element mit extrem starker Bindungskapazität (Diplomarbeit O. Friese, 2000). Dieses S/MAR ist ein EcoRI-Subfragment eines 13 kbp großen PCR-Produktes, welches aus dem intergenen Bereich zwischen dem IFN $\alpha$ 1-Gen und dem IFN $\gamma$  P19-Gen amplifiziert wurde (siehe Abb. 1.3). Beim Klonierungs-Vektor handelt es sich ebenfalls um pTZ18R.

Die Untersuchung von DNA-Bereichen mit S1 Nuklease ist die klassische Methode für den Nachweis von Einzelstrangcharakter. Sie hat aber den Nachteil, daß sie nur *in vitro* anwendbar ist. Eine Korrelation der Ergebnisse mit den später *in vivo* durchgeführten Analysen unter Verwendung der einzelstrangspezifischen Reagenzien BAA und  $\text{KMnO}_4$  soll die Extrapolation der Daten auf lebende Zellen erlauben.

### 2.1.2.1. Nachweis der S1 Nuklease-Aktivität mittels indirekter Endmarkierung im Southern-Blot

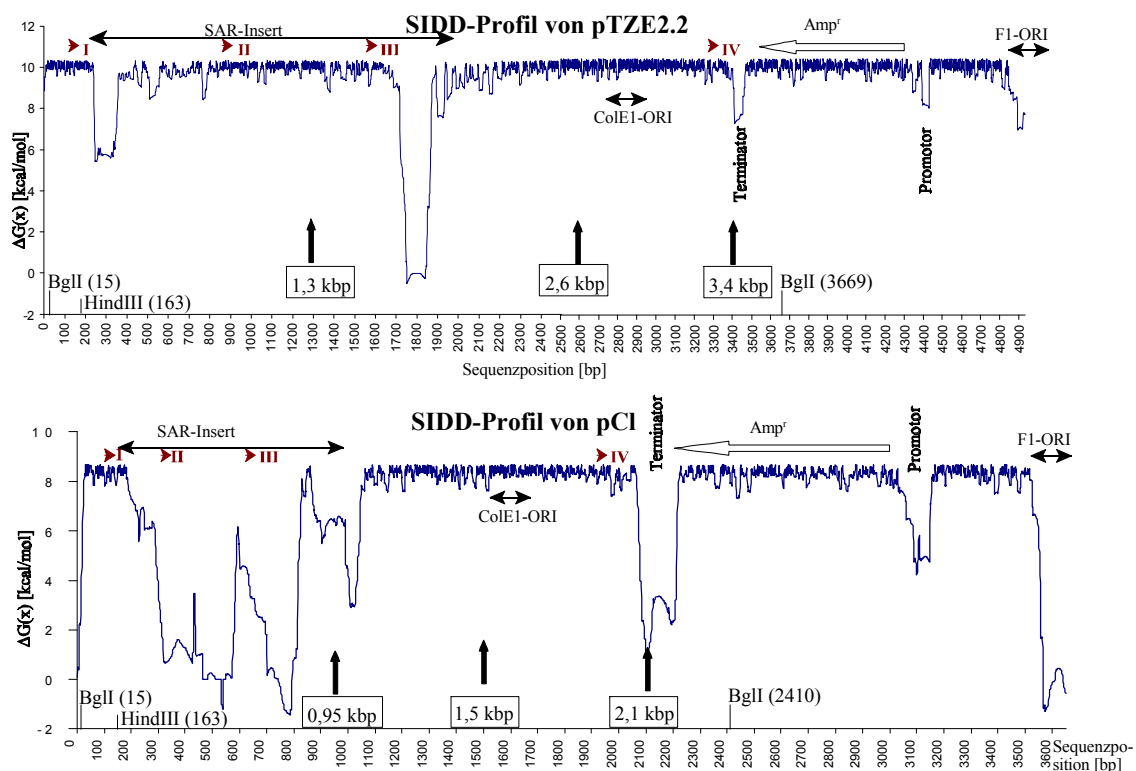
Die ersten Versuche sollten einen Überblick über die in den Plasmiden vorhandenen S1 Nuklease-Schnittstellen liefern. Daher wurde nach der Modifizierung mit S1 Nuklease ein Southern-Blot zum Nachweis der Schnittstellen in einem großen Teil des DNA-Moleküls durchgeführt. Da die Aktivität des Enzyms hauptsächlich zu Einzelstrangbrüchen führt, mußte die Auftrennung im Agarosegel mittels denaturierender Gelelektrophorese erfolgen. In einem nativen Agarosegel konnte zuvor die Effizienz der S1-Behandlung überprüft werden. Mit zunehmender S1-Nuklease-Konzentration nimmt der Anteil an Plasmid-Molekülen unter superhelikaler Spannung ab. Es erscheinen zunehmend Moleküle mit Einzelstrangbrüchen, welche im Gel langsamer laufen. Bei den höchsten Konzentrationen entstehen auch lineare Plasmide, die im Gel zwischen der linearen und der superhelikalen Form laufen (nicht gezeigt).



**Abb.2.2** Southern Blot der Plasmide pTZE2.2 und pCI zum Nachweis von S1 Nuklease-Schnittstellen  
Vor der Modifizierung mit S1-Nuklease wurde der superhelikale Zustand im Agarosegel überprüft. Die Linearisierung erfolgte mittels BglII. Dieses Enzym schneidet an Position 15 und ein zweites Mal am Ende der kodierenden Region des Ampicillin-Resistenzgens (siehe Abb.2.3). Die DNA wurde nach einer Präzipitation in 50 µl S1 Nuklease-Puffer aufgenommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von S1 Nuklease gestartet (0U, 10U, 50U, 100U, 200U, 400U, 800U). Nach 10 min bei 37°C wurde das Enzym durch Zugabe von 100 µl Stop-Puffer inaktiviert. Die Plasmide in der ursprünglich superhelikalen Form wurden mit BglII verdaut. Alle Proben wurden danach in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis erfolgte mittels einer radioaktiv markierten BglII-HindIII-Sonde (148 bp). Da die Sonde genau an einem Fragmentende (BglII-Schnittstelle) bindet, kann, ausgehend von der Größe der nachgewiesenen Banden, auf die Position der S1-Schnittstelle am anderen Fragmentende geschlossen werden (siehe Abb.2.3).

In dem in Abb.2.2 gezeigten Southern-Blot nach der denaturierenden Gelelektrophorese sind beim pTZE2.2-Plasmid in superhelikaler Form an drei Stellen deutliche Signale erkennbar, die mit zunehmender S1 Nuklease-Konzentration sichtbar werden. Das kleinste Fragment von ca. 1,3 kbp ist auf eine Schnittstelle innerhalb des S/MAR-Inserts zurückzuführen (1,3 kbp von BglII an Position 15 entfernt). Das größte Fragment (3,4 kbp) entsteht durch einen S1 Nuklease-Schnitt innerhalb des Ampicillin-Terminators. Ein drittes Fragment von 2,6 kbp Größe korreliert mit einer Schnittstelle kurz vor dem Replikationsstartpunkt (ColE1-, „Origin of Replication“) des Plasmids. Alle drei Signale treten bei Plasmiden unter superhelikaler Spannung bei deutlich niedrigerer S1 Nuklease-Konzentration auf als bei der linearisierten Form, wo erst bei Zugabe von 400U und 800U Enzym Fragmente entstehen.

Der Southern-Blot des pCI-Plasmids zeigt prinzipiell die gleichen Ergebnisse. Auch hier findet sich ein Fragment, das auf eine Schnittstelle im Ampicillin-Terminator zurückgeht (2,1 kbp), und ein weiteres Signal geht auf einen Schnitt vor den Replikationsstartpunkt zurück (1,3 kbp). Innerhalb des S/MAR-Inserts gibt es ebenfalls eine Schnittstelle (ca. 950 bp ab BglII-Schnittstelle bei Position 15), die aber nicht so deutlich ausgeprägt ist wie bei pTZE2.2. Wieder treten alle



**Abb.2.3:** SIDD-Profil der Plasmide pTZE2.2 und pCI mit den im Southern-Blot ermittelten S1 Nuklease-Schnittstellen.

Die Position des Ampicillin-Gens, der inserierten S/MAR-Elemente und der Replikationsstartpunkte sind eingetragen. Die im Southern-Blot ermittelten Positionen der S1-Schnittstellen sind mit senkrechten Pfeilen und den Angaben zur Fragmentgröße gekennzeichnet (vgl. Abb.2.2). Die für die LM-PCR-Reaktionen eingesetzten Primer sind als kleine Pfeile über dem Graphen eingezeichnet. Jeder Pfeil steht dabei für ein Primer-Set bestehend aus drei überlappenden Primern (vgl. Abb.4.1).

drei Fragmente bei Plasmid unter superhelikaler Spannung bei deutlich geringeren S1-Nuklease-mengen auf als bei der linearen Kontrolle.

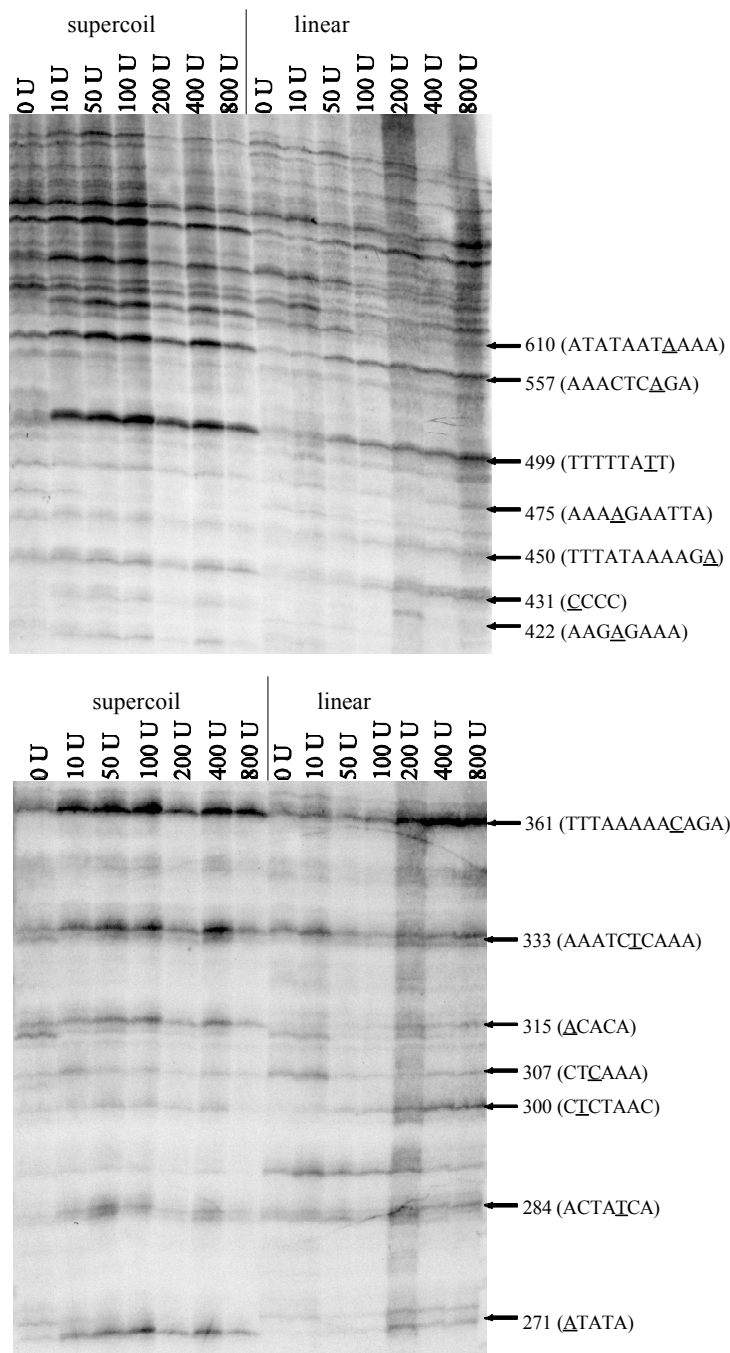
Ordnet man die gefundenen Schnittstellen in das SIDD-Profil der Plasmide ein (Abb.2.3), findet man eine sehr gute Korrelation zur destabilisierten Stelle am Ampicillin-Terminator. Innerhalb des S/MAR-Inserts gibt es dagegen keine deutliche Übereinstimmung zu destabilisierten Peaks. Auch die Schnittstelle nahe des Replikationsstartpunktes kann mit keinen destabilisierten Regionen korreliert werden. Um die Positionen der S1-sensitiven Nukleotide genau bestimmen zu können, wurden im Folgenden einzelne Bereiche mit Hilfe der LM-PCR-Methode untersucht. Die dafür verwendeten Primer-Sets sind in Abb.2.3 eingetragen.

#### **2.1.2.2. Nachweis der S1 Nuklease-Schnittstellen mittels LM-PCR mit Einzelnukleotid-Auflösung**

Die LM-PCR an den mit S1 Nuklease modifizierten Proben ergab bei allen Primer-Sets eine deutliche S1-Aktivität. Die Abbildungen 2.4A und B demonstrieren beispielhaft dieses Ergebnis. Abb.2.4A zeigt das Sequenziergel nach der LM-PCR mit Primer-Set I an pCI-Plasmid. Es wurden jeweils parallel superhelikale und lineare DNA untersucht. Deutlich erkennbar ist, daß die meisten Fragmente bei superhelikaler DNA mit wesentlich höherer Signalstärke erscheinen als bei der linearen Kontrolle. (Besonders markant ist das bei Position 499.) Die Positionen der ermittelten S1 Nuklease-Schnittstellen sind zusammen mit den zugehörigen Sequenzausschnitten neben dem Gel angegeben. Auffällig ist die hohe Anzahl von T- oder A-reichen Motiven (TA-, TC-, AC- oder AG-Wiederholungen). Aber auch invertierte Sequenzwiederholungen oder PolyA Motive sind vertreten. Das modifizierte Nukleotid ist innerhalb des Sequenzmotivs unterstrichen dargestellt. Die eingetragenen Modifizierungs-Stellen können aber um einige Basen nach rechts oder links verschoben sein, da in einigen Fällen die exakt genaue Positionsbestimmung schwierig war. Besonders im oberen Teil eines Sequenziergels ist die Fragmentauftrennung nicht optimal. Auch in Abb.2.4B, die die LM-PCR an pCI mit Primer-Set II zeigt, können deutliche S1 Nuklease spezifische Fragmente bei superhelikaler DNA nachgewiesen werden. Ein interessanter Aspekt ist hier das Signal bei Position 501. Diese Schnittstelle liegt am Rand eines relativ ausgedehnten ATC-Bereiches. Dies sind Sequenzabschnitte in denen über mehr als 20 bp auf einem Strang nur A-, T- und C- Nukleotide und auf dem anderen Strang entsprechend nur A-, T- und G- Nukleotide vorkommen. Nach den Ergebnissen von Nakagomi et al.(1994) kann man in einem solchen Bereich mehrere einzelstrangspezifische DNA-Schnitte erwarten. Die S1 Nuklease schneidet aber nur am Rand, innerhalb des Motivs finden sich keine Signale.

Diese Beobachtung konnte auch in anderen Bereichen gemacht werden. So gibt es im pTZ2.2-Plasmid ein 22 bp langes ATC zwischen 305 und 327. Auch hier gibt es nur eine Modifizierungsstelle bei 323. Ebenso verhält sich ein 27 bp langes ATC-Motiv in der Ampicillin-

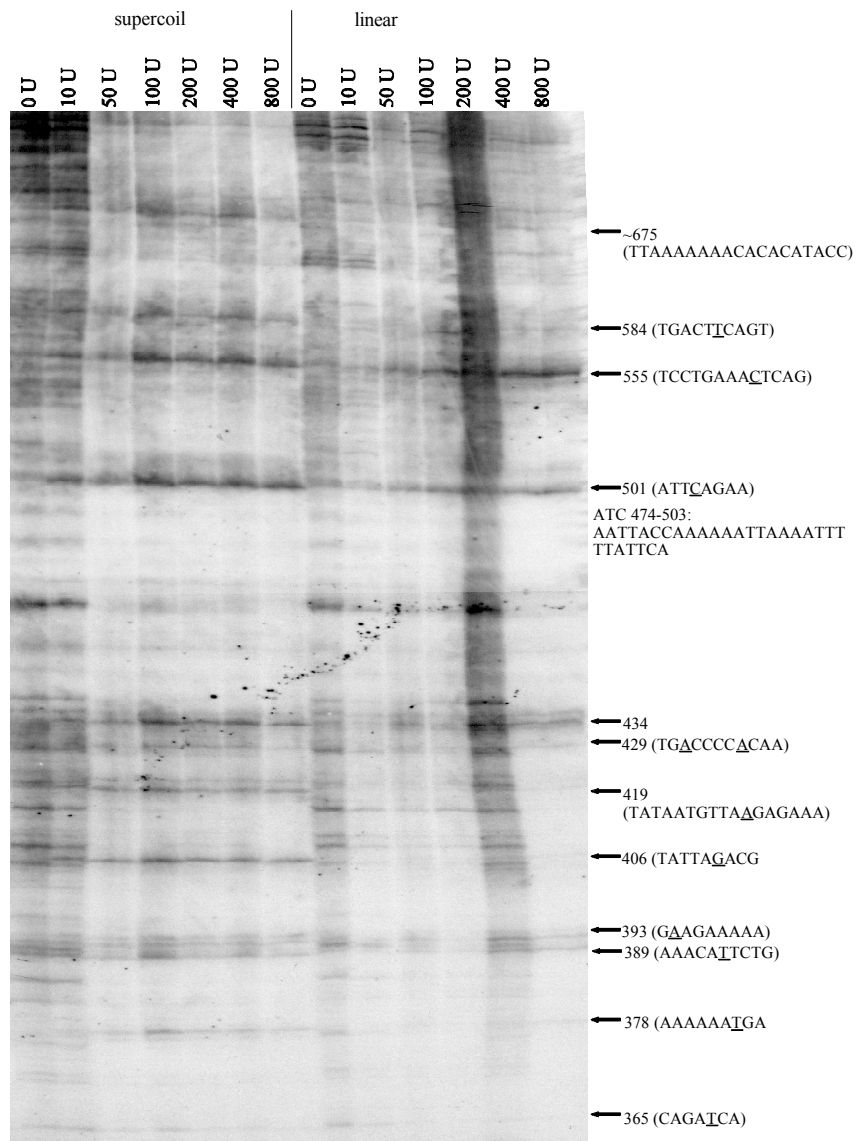




**Abb.2.4.A:** Sequenziergel nach LM-PCR an pCl-Plasmid mit Primer-Set I. Es wurden jeweils superhelikale und lineare DNA parallel behandelt. Die DNA wurde gefallt und in 25  $\mu$ l S1 Puffer aufgenommen. Durch Zugabe der entsprechenden Menge an S1 Nuklease wurde die Reaktion gestartet. Nach 10 min bei 37  $^{\circ}$ C wurde das Enzym durch Zugabe von 100  $\mu$ l Stop-Puffer inaktiviert.

Die Positionen der Schnittstellen im Plasmid sind an der Seite angegeben. Gleichzeitig wurde ein Ausschnitt aus der Sequenz dargestellt und die wahrscheinlich modifizierte Base unterstrichen.

Terminator-Region (pCI-Position 2152-2179). Hier schneidet die S1-Nuklease nur am 20. Nukleotid des ATCs.



**Abb.2.4B:** Sequenziergel nach LM-PCR an pCI-Plasmid mit Primer-Set II.

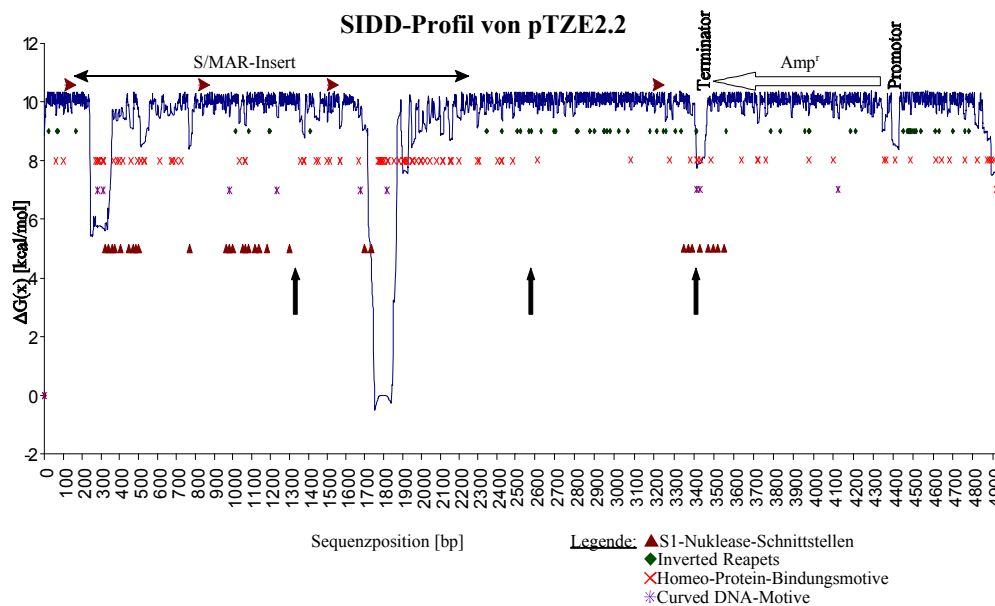
Die Positionen der ermittelten S1 Nuklease-Schnittstellen sind neben dem Gel gemeinsam mit den zugehörigen Sequenzmotiven gekennzeichnet. Die Durchführung erfolgte wie unter Abb.2.4A beschrieben.

Eine zusammenfassende Betrachtung aller auftretenden Sequenzmotive, die durch die S1 Nuklease geschnitten werden, ergab eine besondere Häufung von AT-reichen Sequenzen. Tabelle 2.1, faßt die Ergebnisse zusammen.

An fast allen Schnittstellen treten Sequenzwiederholungen von TA-, TC-, CA- oder GA-Motiven auf (hier unterstrichen dargestellt). Oft sind auch poly-A oder poly-T Motive sind vertreten. Unter „andere“ sind Motive zusammengefaßt, die mehr als zwei Nukleotidtypen enthalten. Typisch sind aber auch hier direkte oder „gespiegelte“ Sequenzwiederholungen und ein hoher Anteil an repetierten A- oder T-Nukleotiden.

**Tab.2.1:** Zusammenfassung der von S1 Nuklease geschnittenen Sequenzmotive bei Experimenten an den Plasmiden pTZE2.2 und pCl. Die unterstrichenen Bereiche sind direkte Sequenzwiederholungen, die in 24 der 37 Motive zu finden sind.

TA-Motive	CA-Motive	GA-Motive	TC-Motive	A <sub>n</sub>	andere
<u>ATATA</u>	<u>ACACA</u>	<u>AGAGA</u>	<u>CTCT</u>	AAAAA	ACTATCA
<u>TATATA</u>	<u>ACACACA</u>	GGAAG <u>GAG</u>	<u>TCTCTCT</u>	AAAAAA	AACTCAA
		<u>AGA</u>		A	
<u>AAAAAATTAA</u>	<u>CCACCACA</u>	<u>GAAGAAAA</u>	<u>TCTCTTTTC</u>	AAAAAA	ACAATAA
<u>AATTTTTATT</u>		A	CT	AAAGAA	CA
				AAA	
TATAATAAAA	CCCCACAAC	AAGAGAAA	TTTTTCCA		GACACAG
AAAATT <u>TA</u>	AAAACCA		<u>TTTTTTCTT</u>		ATGATG
<u>ATTTT</u> TA			<u>TTTCT</u>		
<u>TATAAAT</u>	<u>ACACCAA</u>		CTCT <u>TTCTT</u>		AAAT
			<u>CCTC</u>		CTAAA
AAATT <u>TA</u>	AAAACACAACA				ACTCA
<u>ATAAAAA</u>	<u>A</u>				
<u>ATTATTTT</u>	<u>ACACAA</u>				
TTTAA					



**Abb.2.5A:** SIDD-Profil von pTZE2.2-Plasmid.

Die ermittelten Positionen der S1-Schnittstellen aus den LM-PCR-Versuchen sind durch rote Dreiecke gekennzeichnet. Die Positionen der im Southern-Blot ermittelten Schnittstellen sind durch die schwarzen Pfeile markiert. Die Lage des S/MAR-Insertions-Fragmentes und die des Ampicillins, sowie die Positionen der verwendeten Primer sind über dem Graphen eingezeichnet.

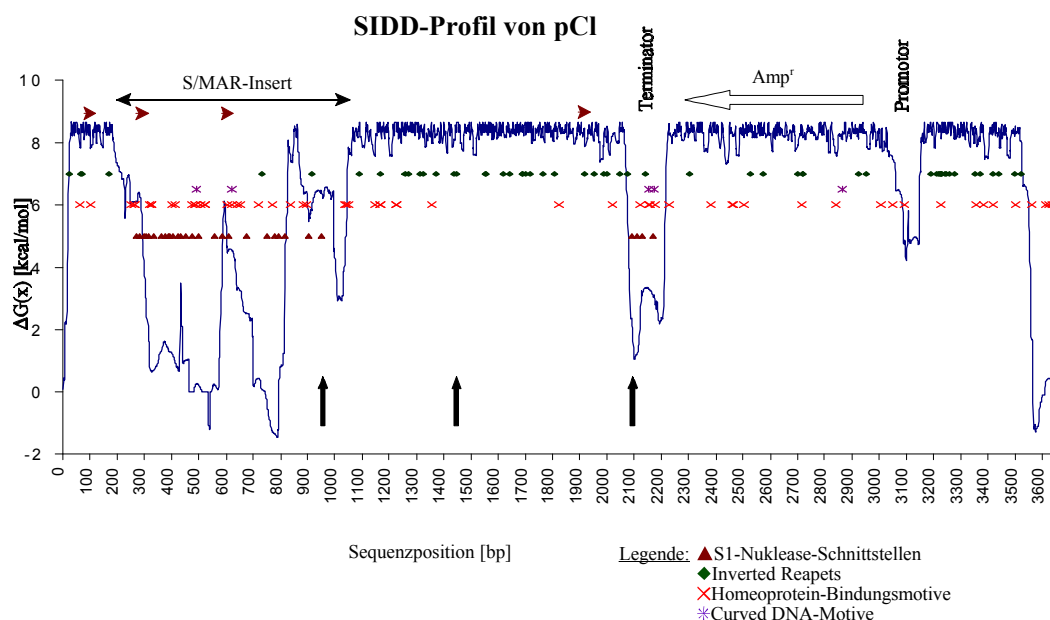
Die Positionen von „Inverted Repeats“, Sequenzen, die zu „Curved“ Konformation führen sowie von Homeo-Protein-Bindungsmotiven sind ebenfalls eingetragen. Die Nomenklatur der verwendeten Symbole ist der Legende zu entnehmen. Die Sequenzanalysen zur Identifizierung dieser Motive wurden mit dem Computerprogramm *gcg* durchgeführt. Bei der Suche nach „Inverted Repeat“-Sequenzen wurden nur Motive mit mindesten 10 Basen und 20 Basenpaarungen im Stamm der sich ausbildenden Haarnadelstruktur zugelassen, um eine hohe Stringenz der Vorhersage zu gewährleisten.

Ein Ziel der Untersuchungen war der Abgleich der biochemischen Experimente mit den Daten der S/MAR-Vorhersageprogramme. Dafür wurden die Positionen der ermittelten S1-Schnittstellen aus allen Versuchen zusammengefaßt und im zugehörigen SIDD-Profil eingetragen (Abb.2.5A und B).

In Abb.2.5A sind die Ergebnisse für das pTZE2.2-Plasmid dargestellt. Das Ergebnis des Southern-Blots, wonach bei 1300 ein S1 Nuklease-Schnitt auftritt, bestätigt sich auch in den LM-PCR-Daten. Innerhalb der großen Peaks bei 250 und 1800 gibt es dagegen keine besondere Häufung von Nuklease-Schnitten. Die identifizierten Stellen liegen vielmehr am Rand oder außerhalb dieser ausgeprägten destabilisierten Regionen.

Anders verhält es sich mit den Positionen der Schnittstellen in der Ampicillin-Terminatorregion. Hier finden sich über den gesamten destabilisierten Bereich Sequenzen, die die Einzelstrang-Endonuklease erkennt und schneidet.

Da es eine unerwartete Häufung von S1 Nuklease-Erkennungsstellen in nicht vom SIDD-Profil vorhergesagten Bereichen gab, wurde in der Sequenz nach möglichen Motiven, die besondere Sekundärstrukturen bedingen können, gesucht. Dabei fiel eine große Anzahl von „Inverted Repeats“, die unter superhelikaler Spannung zur Ausbildung von Haarnadel-Strukturen führen können, im Bereich um Position 1000 auf (In der Graphik dargestellt durch —). Die S1-Schnittstellen bei Position 1000 und 1067 liegen an der Basis von möglichen „Cruciform“-Strukturen und die bei Position 1083 liegt innerhalb des „Loops“ einer Haarnadelstruktur. Da S/MAR-Elemente häufig durch Sequenz-Motive charakterisiert sind, welche zu „Curved“-DNA Strukturen, also gebogener DNA-Konformation, führen, wurden auch die Positionen solcher Motive in das Profil eingetragen (AAAAAn<sub>7</sub>AAAAAn<sub>7</sub>AAAA gekennzeichnet mit **t**). Außerdem finden man häufig Bindungsmotive von Homeoproteinen (ATTA, ATTTA, ATTTTA), (Boulikas, 1992). Deren Positionen sind mit **V** markiert. In dem untersuchten Plasmid finden sich sehr viele dieser Bindungsmotive in den stark destabilisierten Bereichen konzentriert. Auch die Motive, die zu einer „Curved“-Konformation führen, liegen in den Peaks des Profils, aber es gibt auch zwei dieser Sequenzen in der Mitte des S/MAR-Inserts bei 981 und 1235 im Bereich der besonderen S1 Nuklease-Sensitivität. Eine interessante Beobachtung ist die hohe Anzahl an invertierten Sequenzmotiven im gesamten Vektorrückgrat, die ebenfalls zu Haarnadelstrukturen führen können. Ein etwas anderes Bild zeigt die Auswertung der Experimente am pCI-Plasmid (Abb.2.5B). Hier



**Abb2.5B:** SIDD-Profil von pCI-Plasmid mit den ermittelten Positionen der S1 Nuklease-Schnittstellen (rote Dreiecke). Die schwarzen Pfeile markieren S1-Schnittstellen aus dem Southern-Blot-Experiment. (Weitere Erläuterungen in Abb.2.5A)

findet man in der gesamten destabilisierten Insertionsregion S1-Schnittstellen. Die am Rand des S/MAR-Fragmentes gelegene im Southern-Blot gefundene Position wurde wie bei dem pTZE2.2-Plasmid durch die LM-PCR bestätigt. Ebenfalls identisch ist das Resultat im Ampicillin-Terminator-Bereich. Es gibt Schnittstellen über den gesamten Sequenzabschnitt.

Auch in der Sequenz des pCI-Plasmids findet man sehr viele invertierte Motive (—). Allerdings befinden sich nur zwei direkt innerhalb der destabilisierten S/MAR-Region. Sie korrelieren mit den Spitzenwerten der betroffenen Peaks. Innerhalb des S/MAR-Elementes können wiederum viele Homeoprotein-Bindungsmotive (V) sowie eine Anzahl von potentiellen „Curved“-Strukturen (t) beobachtet werden.

Die Verwendung von S1 Nuklease zum Nachweis einzelsträngiger DNA ergab bei *in vitro*-Experimenten sehr eindrucksvolle Ergebnisse und ermöglichte einen Überblick über strukturelle Eigenschaften der untersuchten S/MAR-Elemente im Vergleich zu den Vorhersagen des SIDD-Profiles. Eine direkte Übertragung des Versuchsdesigns auf die Analyse der DNA in lebenden Zellen erwies sich als problematisch, da die Ionenbedingungen innerhalb der Zellen nicht genau definierbar bzw. einstellbar sind. Die hohe Spezifität der S1 Nuklease für Einzelstrang-DNA hängt aber wesentlich von den Pufferbedingungen ab und kann aufgrund dessen *in vivo* nicht erreicht werden.

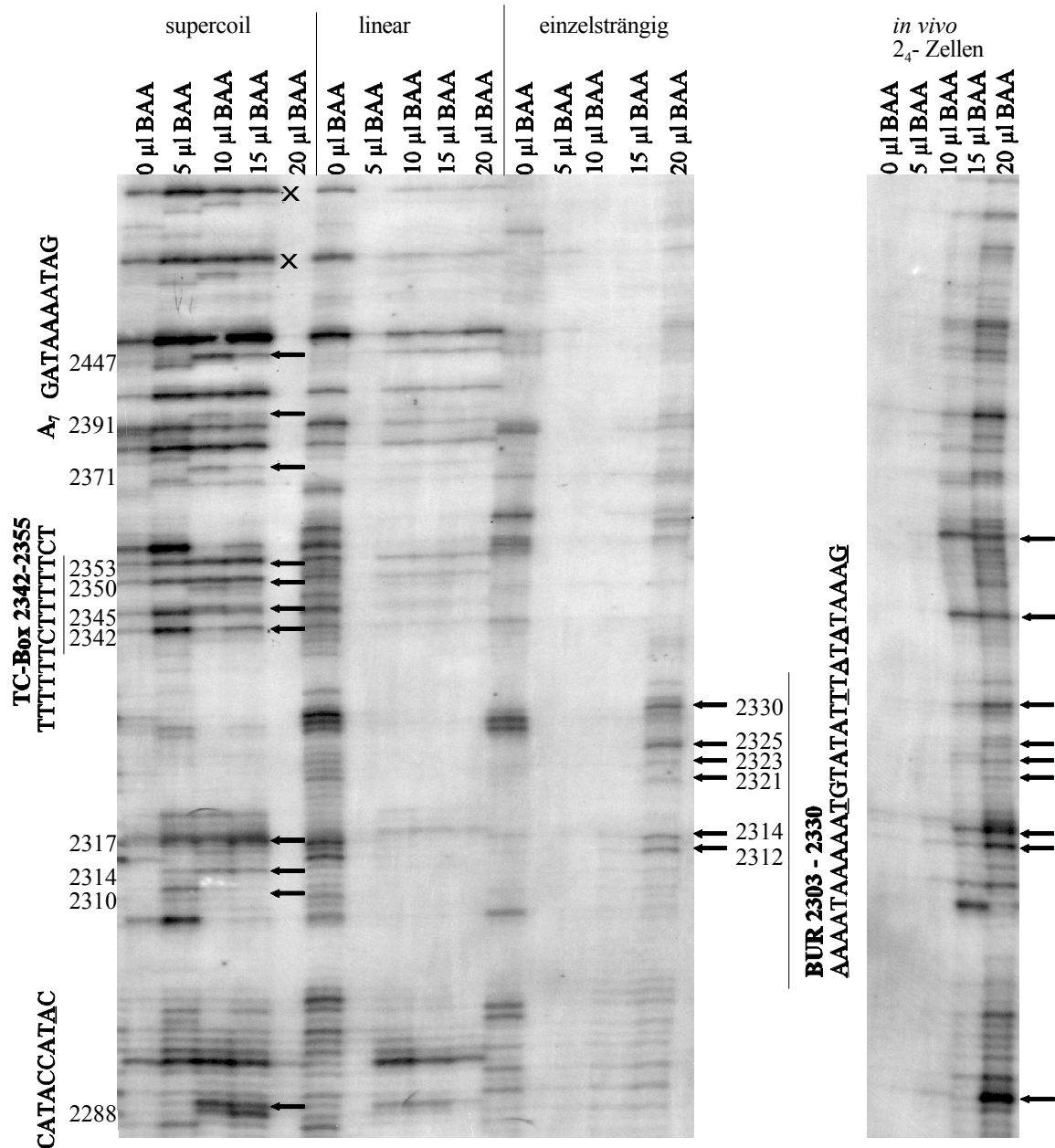
Um diese Problematik zu umgehen, wurden Experimente mit Einzelstrang-spezifischen Chemikalien angeschlossen. Die Spezifität der verwendeten Reagenzien ist nicht in diesem hohen Maße von den Ionenbedingungen abhängig, so daß eine Anwendung *in vivo* möglich ist.

### **2.1.3. Nachweis des Einzelstrang-Charakters der DNA in S/MAR-Elementen durch BAA-„footprinting“**

Die Nutzung chemischer Reagenzien zur gezielten Modifikation von DNA-Molekülen wurde in früheren Arbeiten beschrieben. Die wohl bekannteste Anwendung solcher Chemikalien ist die Sequenziermethode nach Maxam und Gilbert (1977).

Bromacetaldehyd (BAA) und Chloracetaldehyd (CAA) sind klassische Reagenzien für derartige Experimente und wurden bereits erfolgreich für den Nachweis von Einzelstrang-Motiven innerhalb einer DNA-Sequenz *in vitro* verwendet (Bode et al. 1992). Der Reaktionsmechanismus ist bei beiden Stoffen identisch und wurde bereits in Abb. 2.1.B näher beschrieben.

In Kapitel 2.1.2. wurde gezeigt, daß S/MAR-Elemente *in vitro* einzelsträngige, S1 Nuklease-sensitive Bereiche aufweisen. Das nächste Ziel war die Analyse der Struktur dieser Bereiche *in vivo*. Um die Spezifität der Chemikalie BAA zu testen, wurden zuerst Versuche an Plasmid-DNA durchgeführt. Das dafür verwendete Plasmid pTZE20 enthält ein 2 kbp großes S/MAR-Fragment aus der IFN $\alpha$ -Domäne (EcoRI-Fragment „E“). In den S1 Nuklease-Experimenten war zuvor ein Teil dieses Fragmentes - das S/MAR800 - untersucht worden. Die Daten der Plasmid-



**Abb.2.6:** BAA-Modifikation *in vitro* an pTZE20-Plasmid und *in vivo* an 2<sub>4</sub>-Zellen

Die *in vitro*-Modifikation wurde an 10 µg Plasmid-DNA in 100 µl Reaktionsvolumen durch Zugabe der angegebenen Mengen an BAA gestartet und nach 1 Stunde bei 37°C durch Fällung und mehrmaliges Waschen gestoppt. Danach schloß sich eine Inkubation mit Piperidin zur Spaltung der modifizierten Basen an. Die Zustandsformen der Plasmide-Moleküle wurde vor dem Experiment im Agarosegel kontrolliert.

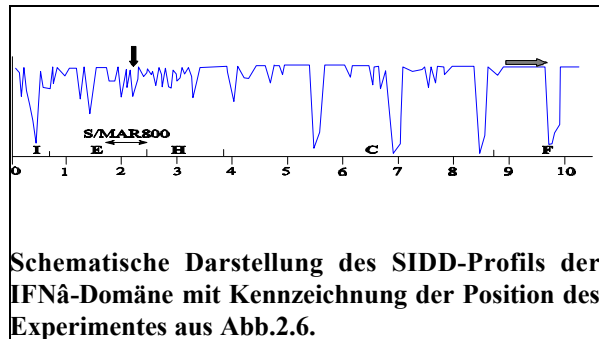
Die *in vivo*-Modifikation wurde an permeabilisierten 2<sub>4</sub>-Zellen auf großen Zellkulturschalen durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Stoppuffer beendet und die Zellen lysiert. Die Piperidin-Behandlung erfolgte nach der Aufarbeitung der genomischen DNA.

Eine genaue Beschreibung der Modifikationsprozedur findet sich im Abschnitt 4.6.4.

Die relevanten Signale, die nur bei BAA-modifizierten Proben auftreten, sind in der Abbildung durch Pfeile gekennzeichnet. Die Angaben über die Position der modifizierten Basen beziehen sich auf die IFN $\alpha$ -Domäne und sind - zusammen mit auffallenden Sequenzmotiven - an den entsprechenden Stellen eingetragen. Unspezifische Amplifikate sind beispielhaft mit \* markiert. Beide Teile der Abbildung zeigen den gleichen Ausschnitt, die Positionsangaben können daher auf den jeweils anderen Teilausschnitt übertragen werden.



Experimente wurden dann mit den Ergebnissen der Modifizierung des gleichen S/MAR-Elementes *in vivo* verglichen. Für diese Analysen wurde die 2<sub>4</sub>-Zelllinie verwendet. Dabei handelt es sich



Schematische Darstellung des SIDD-Profiles der IFNα-Domäne mit Kennzeichnung der Position des Experimentes aus Abb.2.6.

um eine murine Fibroblasten-Zelllinie, welche 100 funktionelle Kopien der IFNα-Domäne trägt (Hauser et al.,1982; Bode und Maass, 1988). In der nebenstehenden schematischen Zeichnung ist die Position der Untersuchungen mit BAA innerhalb der IFNα-Domäne mit einem Pfeil gekennzeichnet (vgl. Abb.1.4).

In Abb.2.6 ist das Ergebnis der BAA-Modifizierung von Plasmid-DNA in verschiedenen Zustandsformen im Vergleich zur Modifizierung genomischer DNA *in vivo* an 2<sub>4</sub>-Zellen dargestellt. Die Zustandsformen der Plasmidmoleküle wurden vor der BAA-Behandlung im Agarosegel kontrolliert. Die Linearisierung erfolgte mit BglI.

Aus der Abbildung wird deutlich, daß die Behandlung von Plasmid-Molekülen in superhelikaler Form mit BAA in einem deutlich von der Kontrolle unterschiedlichen Fragmentmuster resultiert (Spur 2 [5 µl BAA] -5 [20 µl BAA] im Vergleich zu Spur 1 [0 µl BAA]). An den Positionen 2288 und 2447 werden Nukleotide innerhalb von „gespiegelten Repeat“-Motiven modifiziert. Die bereits früher definierte „base unpairing“-Region (BUR) zwischen 2303 und 2330 wird ebenfalls an drei Stellen von BAA verändert. Außerdem können zusätzlich Modifikationsstellen innerhalb eines TC-reichen Bereiches festgestellt werden. Vergleicht man das Fragmentmuster mit dem von linearem Plasmid, wird deutlich, daß dort hauptsächlich die unspezifisch amplifizierten Fragmente, die auch in den Kontrollspuren auftreten, sichtbar werden (z.B. oberhalb der Bande bei 2447; gekennzeichnet mit \*). Die BAA-spezifischen Fragmente aus Spur 2 - 5 treten hier nicht auf. Auffällig ist die hohe Anzahl von Fragmenten in der Kontroll-Spur ohne BAA-Behandlung. Dieses Muster muß auf PCR-Artefakte zurückgehen. Der Einfluß, den die PCR selbst auf die Muster der entstehenden Fragmente hat, wird in einer Fehlerdiskussion in Kap.3.2.1 besprochen.

Die Modifikation von einzelsträngiger Plasmid-DNA sollte sehr effizient sein, da hier alle C- und A-Nukleotide mit BAA reagieren. In der PCR sieht man letztendlich kein deutliches Fragmentmuster. Nur im Bereich der BUR zeigen sich einige Banden bei der höchsten BAA-Konzentration. Dieser Effekt hängt damit zusammen, daß der Abbau-Grad dieser DNA nach der Piperidin-Behandlung zu stark ist und eine effiziente PCR nicht mehr möglich ist.

Ein Vergleich des Fragmentmusters von Plasmid-DNA mit dem aus der Modifikation von genomischer DNA *in vivo* ergab, daß auch hier eine Reihe der schon beschriebenen Stellen



modifiziert wurde. Besonders auffällig ist die hohe Anzahl von Banden im BUR-Bereich. Die anderen Fragmente (außer dem bei 2288) treten dahinter an Deutlichkeit zurück. Augenfällig ist die Übereinstimmung des Fragmentmusters mit dem der denaturierten Plasmid-Form.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Bromacetaldehyd *in vivo* zur Modifikation von spezifischen Sequenzmotiven führt. Das Muster der Modifikation unterscheidet sich von dem an superhelikalem Plasmid gefundenen. Die hier identifizierten Modifikationsstellen sind spezifisch für superhelikale DNA und treten nicht bei linearen Plasmid-Formen auf. Im einzelsträngigen Plasmid findet eine derart effiziente Reaktion statt, daß eine anschließende PCR nicht mehr funktioniert.

Ein Vergleich der modifizierten DNA-Nukleotide mit den zugehörigen  $\Delta G(x)$ -Werten im SIDD-Profil zeigte, daß Basen auf der gesamten Länge des destabilisierten Peaks im S/MAR800 reaktiv sind.

Die Verwendung von BAA in den beschriebenen „footprinting“-Experimenten ist zum Nachweis einzelsträngiger DNA-Bereiche *in vivo* geeignet. Um die Ergebnisse zu bestätigen und abzusichern, wurde Kaliumpermanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) in die „footprinting“-Techniken aufgenommen. Die Verwendung dieser Chemikalie hat den Vorteil viel kürzerer Reaktionszeiten (1 - 3 sec im Vergleich zu 30 min). Im nächsten Abschnitt sind die Ergebnisse dieser Experimente beschrieben.

#### **2.1.4. Nachweis des Einzelstrang-Charakters der DNA durch Kaliumpermanganat-„footprinting“**

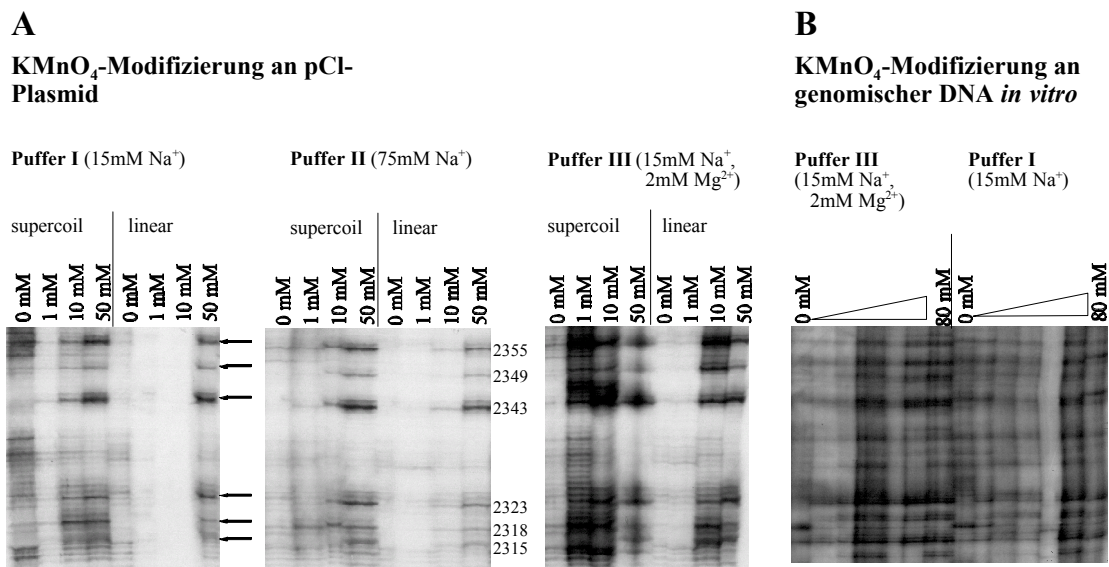
Die Verwendung von  $\text{KMnO}_4$  zum Nachweis von Einzelstrangcharakter an genomischer DNA *in vivo* mittels LM-PCR stützt sich auf ein von HersHKovitz und Riggs (1997) veröffentlichtes Protokoll. Wie bereits in Abb.2.1B näher geschildert, reagiert das Reagenz vor allem mit einzelsträngigen T-Nukleotiden. Da die Zielnukleotide nach der  $\text{KMnO}_4$ -Inkubation noch nicht gespalten sind, ist eine Nachbehandlung mit Piperidin erforderlich. Kontrollexperimente, welche das demonstrieren, sind in der später folgenden Abb.2.10A auf S.42 gezeigt. In dieser Abbildung wurden u.a. Proben für die LM-PCR verwendet, die nach der  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung nicht mit Piperidin geschnitten wurden. In diesen Proben waren keine Fragmente amplifizierbar. Eine weitere Kontrolle in dieser Abbildung zeigt, daß auch die sehr vorsichtige DNA-Isolierung mit geringen Umdrehungszahlen während der Zentrifugation nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse wegen möglicher Verluste kleiner Fragmente führt. In zwei Spuren der Abb.2.10A sind Proben aufgetragen, die LM-PCR-amplifizierte Fragmente nach  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung, sehr intensiver Zentrifugation und Piperidin-Nachbehandlung zeigen. Es sind keine zusätzlichen Signale im Vergleich zu den Proben aus der normalen DNA-Isolierung erkennbar. Diese Experimente bestätigen, daß während der  $\text{KMnO}_4$ -Behandlung der DNA keine Strangbrüche entstehen.

Die betreffenden Nukleotide werden lediglich modifiziert und müssen daraufhin spezifisch mit Piperidin gespalten werden, da die Polymerase in der Primer-Extension-Reaktion nicht an den veränderten Basen stoppt.

Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu bestimmen, wurden in einer ersten Versuchsreihe verschiedene *in vitro* Experimente an Plasmid-DNA durchgeführt. Hierfür wurde ausschließlich ein Primer-Set in der LM-PCR verwendet, welches im S/MAR800-Element innerhalb des E-Fragmentes der IFN $\alpha$ -Domäne bindet. An diesem S/MAR-Fragment waren bereits positive Ergebnisse beim BAA- und S1 Nuklease-„footprinting“ erzielt worden.

#### 2.1.4.1. Untersuchung des Einflusses der Ionenbedingungen auf den Einzelstrang-Charakter der DNA

Die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenzien BAA und  $\text{KMnO}_4$  zum Nachweis des Einzelstrang-Charakters der DNA haben wie oben bereits angedeutet keine starken Spezifitätsschwankungen bei Veränderung der Ionenbedingungen während der Modifizierung. Es gibt



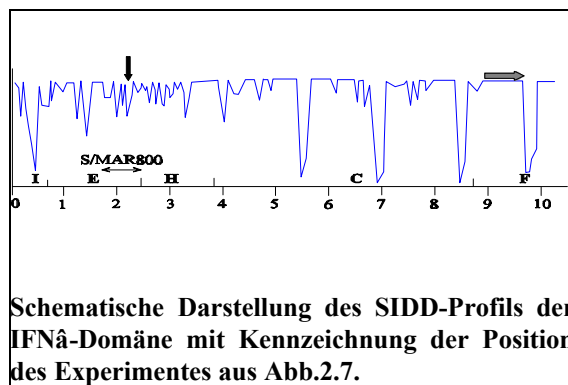
**Abb.2.7:** Sequenziergel der in der LM-PCR amplifizierten Fragmente nach Modifikation mit  $\text{KMnO}_4$  unter verschiedenen Pufferbedingungen.

A.  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung an pCl-Plasmid. Die superhelikale Form des pCl-Vektors und die vollständige Linearisierung mit HindIII wurden vor der Modifizierung im Agarosegel kontrolliert. Die  $\text{KMnO}_4$ -Inkubation erfolgte für 2 min bei Raumtemperatur in Basis-Reaktionspuffer, welcher mit den angegebenen Mengen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen versetzt war. Die verwendeten Konzentrationen an  $\text{KMnO}_4$  sind über den einzelnen Spuren angegeben.

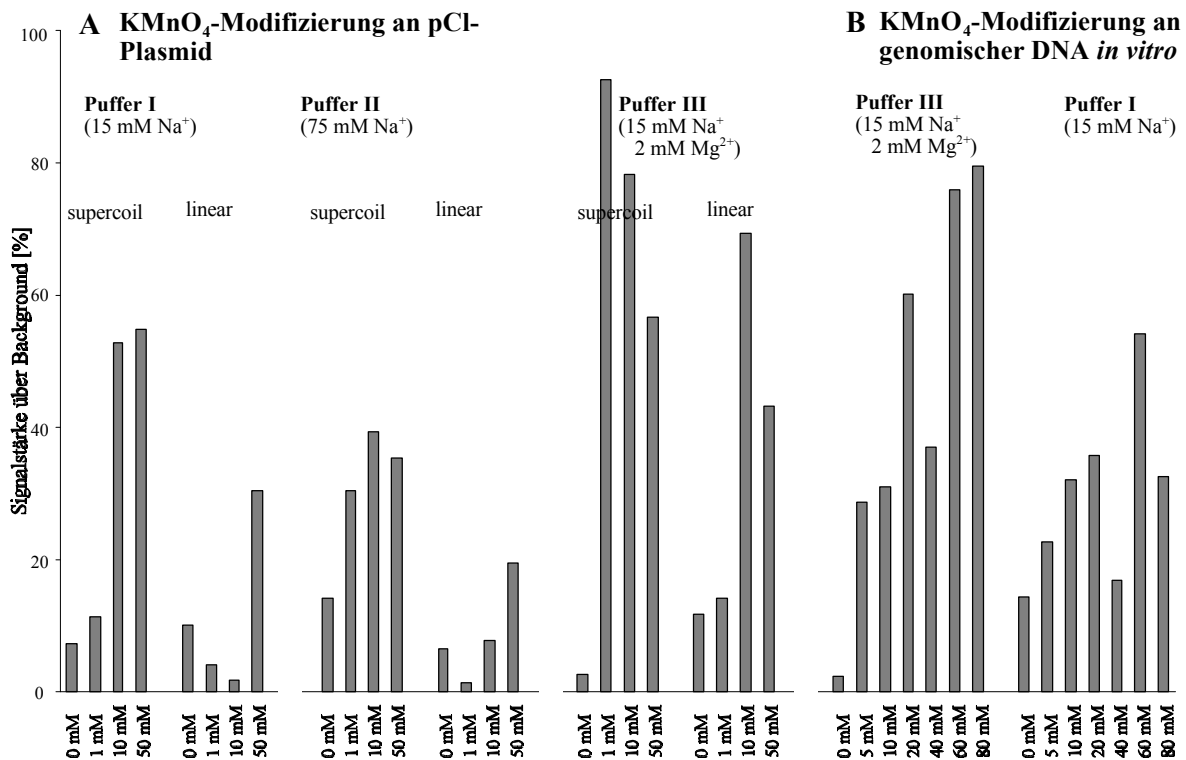
B.  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung an genomischer DNA. Aus MG63-Zellen wurde DNA isoliert und danach mit  $\text{KMnO}_4$  inkubiert. Die Inkubation erfolgte wie in Teil A beschrieben. Es wurden steigende Mengen an  $\text{KMnO}_4$  verwendet (0 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, wie über den Spuren angegeben).

Alle Teilabbildungen zeigen den gleichen Ausschnitt des Sequenziergels. Die  $\text{KMnO}_4$ -spezifischen Fragmente treten bei allen Pufferbedingungen auf (gekennzeichnet in Teilabb.A mit Pfeilen). Die errechneten Positionen der Modifizierungsstellen sind angegeben. Die Angaben beziehen sich auf Positionen innerhalb der IFN $\alpha$ -Domäne.

aber Hinweise, daß die Einzelsträngigkeit der DNA selbst durch die Konzentration von vor allem



zweiwertigen Ionen beeinflussbar ist (Kohwi-Shigematsu und Kohwi, 1990, Kowalski, 1984). Aus diesem Grund wurde die Reaktivität von  $\text{KMnO}_4$  an einem S/MAR-Element bei verschiedenen Pufferbedingungen getestet. In Abb.2.7 ist ein Ausschnitt eines Sequenziergels abgebildet. Die LM-PCR mit E-Fragment spezifischen Primern (Position innerhalb der IFN̈-Domäne ist in der nebenstehenden Zeichnung mittels Pfeil gekennzeichnet) führt in den beiden gezeigten Bereichen zu einem charakteristischen  $\text{KMnO}_4$ -spezifischen Fragmentmuster. Die untere Dreiergruppe an Fragmenten resultiert dabei aus der Modifizierung in der von Bode et al. 1992 definierten BUR zwischen 2303 und 2330. Die anderen drei Fragmente sind  $\text{KMnO}_4$ -sensitiven Nukleotiden innerhalb eines TC-reichen Motivs zwischen 2342 und 2355 zuzuordnen. Die selben Stellen wurden auch bei der Verwendung von BAA modifiziert. Für die Analyse des Einflusses des Pufferbedingungen müssen die Signalstärken der Einzelspuren miteinander verglichen werden. Hierfür ist eine Korrektur mit dem Hintergrund der jeweiligen Spur erforderlich. Mit Hilfe des Computerprogramms *Image Quant 5.0* wurde die Bildpunktdichte jedes einzelnen Signals vermessen und mit dem Hintergrund der dazugehörigen Spur korrigiert. Als Ergebnis erhält man eine Darstellung, die die Fragmentintensität als Signalstärke über dem Spurhintergrund in Prozent beschreibt. Wertet man die Abb.2.7 in dieser Weise aus, ergibt sich für das Fragment an Position 2343 die in Abb.2.8 gezeigte Darstellung. Sowohl in Teil A als auch in B erkennt man, daß die Spuren mit Proben aus Modifikationen mit Magnesium-Ionen stärkere Signale aufweisen als die ohne Magnesium-Ionen im Puffer (Puffer III im Vergleich zu Puffer I und II). Dieser Effekt ist sowohl bei der Modifizierung relativ kleiner Plasmid-Moleküle als auch bei der Analyse von genomischer DNA *in vitro* erkennbar. Die Veränderung der Natrium-Ionenkonzentration hat keinen signifikanten Einfluß auf die Signalstärke der Banden (Puffer I im Vergleich zu Puffer II). Da die Signale der  $\text{KMnO}_4$ -spezifischen Modifizierungen bei Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  im Reaktionspuffer am deutlichsten sind, wurden allen folgenden Experimenten Puffer III als Standard verwendet.

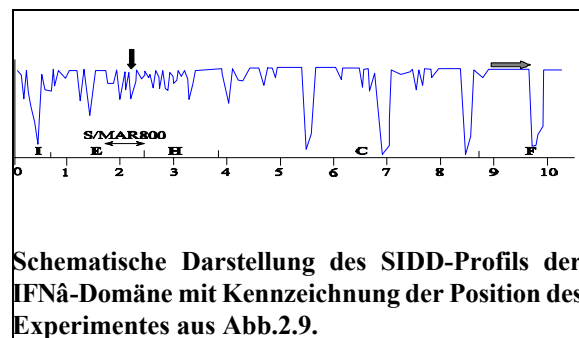


**Abb.2.8:** Graphische Darstellung der Auswertung des Fragmentes an Position 2343 von Abb.2.7. Die Intensität der einzelnen Banden ist als Signalstärkeerhöhung gegenüber dem Hintergrund der einzelnen Spur angegeben. Die Beschriftung der einzelnen Signale erfolgte analog zu Abb.2.7 unter Angabe der verwendeten Menge an KMnO<sub>4</sub>.

Ein weiterer Aspekt in Teil A der Abbildung ist die stets höhere Signalstärke in den Versuchen mit superhelikaler DNA im Vergleich zur linearen Kontrolle. An linearen Plasmid-Molekülen werden die Nukleotide zwar auch durch KMnO<sub>4</sub> modifiziert, dies aber erst bei höheren Konzentrationen. Diese Beobachtung sollte in weiteren Experimenten bestätigt werden.

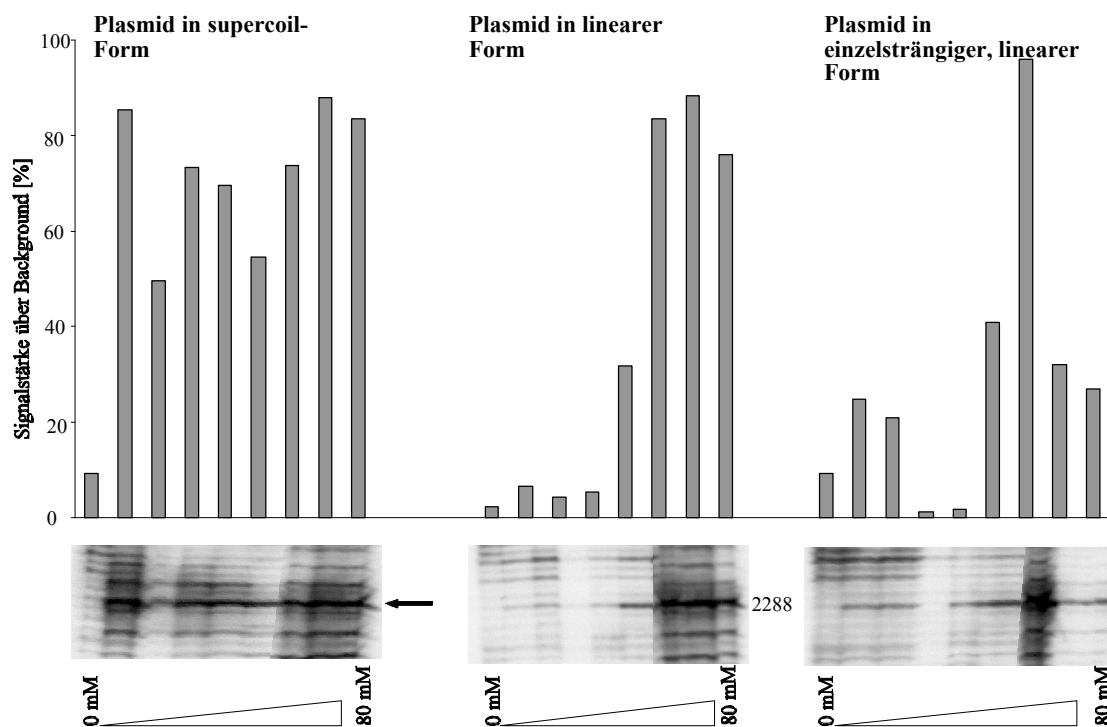
#### 2.1.4.2. KMnO<sub>4</sub>-Modifizierung von Plasmid-DNA in unterschiedlichen Zustandsformen

In Kapitel 2.1.2. konnte in S1 Nuklease „foot-prints“ gezeigt werden, daß die DNA von Plasmiden unter superhelikaler Spannung einzelsträngige Bereiche aufweist. Bei linearer DNA traten die Signale stets nur bei Überschuß an S1 Nuklease auf. Abb.2.9 demonstriert das entsprechende Experiment für die KMnO<sub>4</sub>-Modifizierung. Die Graphik zeigt einen Ausschnitt



**Schematische Darstellung des SIDD-Profiles der IFN $\alpha$ -Domäne mit Kennzeichnung der Position des Experimentes aus Abb.2.9.**

eines Sequenziergels und die Computer-gestützte Auswertung des Signals. Es handelt sich hierbei um ein Fragment, welches durch die Modifizierung des Nukleotids an Position 2288 der IFN $\alpha$ -Domäne generiert wird (siehe schematische Zeichnung). In den Spuren mit den Signalen aus der Analyse der superhelikalen Plasmid-Form sieht man, daß nur bei  $\text{KMnO}_4$ -Zugabe ein Fragment entsteht. Die Modifizierung tritt bereits bei der niedrigsten  $\text{KMnO}_4$ -Konzentration auf. Bei der linearen Plasmid-Form, bei der der Doppelstrang durch Auflösung der topologischen Spannung stabil ist, erscheint das untersuchte Fragment erst bei sehr hohen Konzentrationen des Reagenz. Dann jedoch findet auch hier eine spezifische Modifizierung statt. Dies entspricht den



**Abb.2.9:** Graphische Darstellung der Auswertung des  $\text{KMnO}_4$ -spezifischen Fragmentes an Position 2288 der IFN $\alpha$ -Domäne.

Die Intensität der Signale ist als Signalstärkerhöhung gegenüber dem Hintergrund der jeweiligen Spur aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit *Image Quant 5.0*. Unter der Graphik ist der ausgewertete Ausschnitt des Sequenziergels abgebildet. Die  $\text{KMnO}_4$ -spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Jeder Teilausschnitt zeigt die DNA einer Plasmidform, nach der Modifizierung mit steigenden  $\text{KMnO}_4$ -Konzentration (0 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM  $\text{KMnO}_4$  wie unter den Spuren angegeben).

bei S1 Nuklease Experimenten verzeichneten Beobachtungen. Insgesamt kann man eine deutliche Präferenz der Reaktion von Kaliumpermanganat mit einzelsträngigen DNA-Bereichen, wie sie unter superhelikaler Spannung ausgebildet werden, festhalten. Bei der Verwendung der einzelsträngigen DNA wird nur bei einer scharf definierten  $\text{KMnO}_4$ -Konzentration eine große Menge an Fragment amplifiziert. Bei den meisten Konzentrationen bleibt die Signalstärke jedoch

sehr niedrig. Dieser Effekt wurde bereits bei den Analysen mit BAA beobachtet.

Die Positionen der ermittelten  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierungsstellen wurden im SIDD-Profil mit der Lage der destabilisierten Regionen und mit den Positionen der S1 Nuklease-Schnittstellen verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, daß S1-Schnittstellen und  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierungsstellen in dem untersuchten Bereich gut korrelieren. Die Sequenzen, die  $\text{KMnO}_4$ -reaktiv sind, zählen zu den S/MAR-Element typischen Motiven. Es wurden einzelsträngige T-Nukleotide in TATATA-Motiven, in einem TC-reichen Motiv und im als „core unwinding“-Region definierten Bereich mit der Sequenz TAAAAAATGTATATTTATATAAAGGG nachgewiesen.

Mit dem Nachweis einzelsträngiger DNA innerhalb eines S/MAR-Elementes *in vitro* unter Verwendung des „footprinting“-Reagenz  $\text{KMnO}_4$  war die Etablierung einer einfachen und reproduzierbaren Modifizierungsmethode gelungen. Der nächste Schritt war die Übertragung der Experimente auf die Analyse der DNA-Struktur *in vivo*.

#### **2.1.4.3. Nachweis einzelsträngiger DNA-Bereiche mittels $\text{KMnO}_4$ -„footprinting“ *in vivo***

Die Verwendung von Kaliumpermanganat zum Nachweis von Einzelstrang-DNA eignet sich sehr gut für eine Analyse *in vivo*. Da das Molekül sehr klein ist, dringt es ohne Permeabilisierung in die Zelle ein. Ein weiterer positiver Aspekt ist die sehr kurze Reaktionszeit von 1 - 3 Minuten bei Raumtemperatur.

Für die Analysen *in vivo* standen zwei Zellsysteme zur Verfügung. Die murine  $2_4$ -Zelllinie, welche 100 Kopien der humanen IFN $\beta$ -Domäne trägt, wurde in vielen früheren Untersuchungen zur Regulation des Interferon- $\beta$ -Gens verwendet und ist daher sehr gut charakterisiert (Hauser et al., 1982; Bode et al., 1982). Durch die hohe Kopienzahl waren keine Sensitivitätsprobleme zu erwarten. Die humane Osteosarkomalinie MG63 trägt dagegen nur die endogene Kopien des IFN $\beta$ -Gens, welche aber sehr gut durch Virus-Infektion induzierbar sind. Die Verwendung dieser Zelllinie für die Analysen hat den Vorteil, daß die Ergebnisse möglicherweise den natürlichen vorliegenden Zustand eher widerspiegeln als die Ergebnisse aus den Untersuchungen transfizierter Zellen.

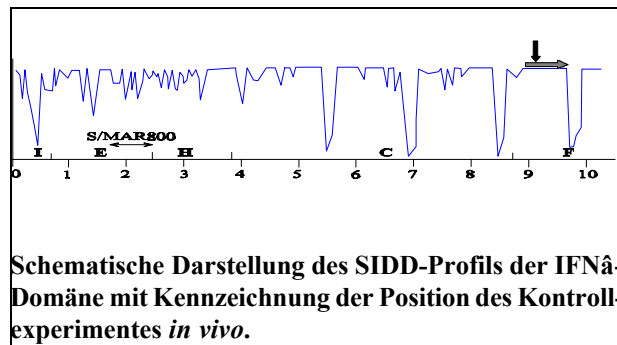
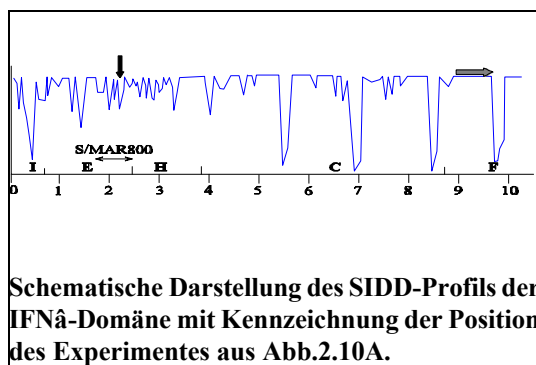
In ersten Versuchen mit  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierungen *in vivo* konnte gezeigt werden, daß sich die Muster der amplifizierten Fragmente von  $2_4$ - und MG63-Zellen nicht unterscheiden.

Die Untersuchungen zur Einzelsträngigkeit der DNA innerhalb der IFN $\beta$ -Domäne wurden an allen prominenten destabilisierten Peaks vorgenommen. Als Kontrollexperiment wurde die DNA der kodierenden Region des IFN $\beta$ -Gens analysiert (Die Position ist der schematischen Zeichnung zu entnehmen). Dieser Bereich ist laut Vorhersage sehr stabil, und daher sollten hier keine spezifischen Fragmente amplifizierbar sein. Die Sequenziergele bestätigten diese Vermutung. Eine LM-PCR in diesem Bereich führte ausschließlich zu unspezifischen Signalen (nicht gezeigt).

Auch die entsprechenden Versuche *in vitro* an Plasmiden mit dem eingebauten F-Fragment aus der Domäne zeigten keine Einzelsträngigkeit.

In allen untersuchten, destabilisierten Bereichen dagegen konnten auf Einzelsträngigkeit zurückgehende  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierungen nachgewiesen werden. Die folgenden Abbildungen demonstrieren das Ergebnis an zwei Beispielen.

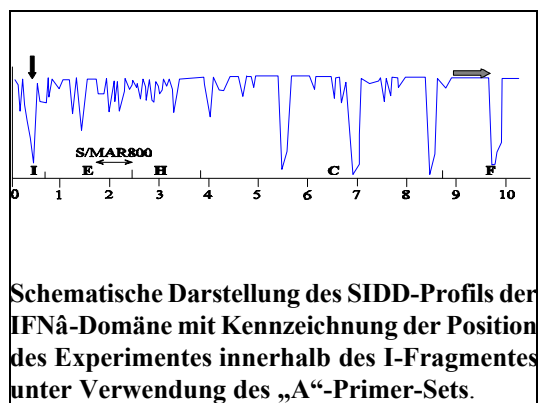
Abb.2.10A zeigt das Ergebnis der Analyse von MG63-Zellen im Bereich des S/MAR800-Elementes. Deutlich erkennbar sind Fragmente in den Spuren mit  $\text{KMnO}_4$ -Behandlung, die in der Kontrolle nicht vorhanden sind. Die modifizierten Nukleotide liegen in der BUR und in der TC-reichen Region sowie in dem T<sub>7</sub>-Motiv bei 2391. Dies sind exakt die selben Stellen, die auch an



Plasmiden unter superhelikaler Spannung als  $\text{KMnO}_4$ -sensitiv identifiziert werden konnten. In den Spuren 1 und 2 der Abb.2.10A sind Proben aufgetragen, die das Ergebnis der  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung an Virus-infizierten MG63-Zellen zeigen. Durch die Infektion wird das Interferon-Gen angeschaltet. Es wird deutlich, daß es zu keinen Veränderungen des Einzelstrang-Charakters in der abgebildeten Region kommt. Das Muster un-

terscheidet sich nicht von nicht-infizierten Zellen. In den Spuren 6 bis 13 sind Proben aufgetragen, die den bereits zu Beginn des Kap.2.1.4 beschriebenen Kontrollexperimenten entstammen. Als Schlußfolgerung aus den Analysen innerhalb des S/MAR800 kann festgehalten werden, daß die DNA des analysierten Bereiches *in vivo* in einzelsträngiger Form vorliegt.

Die Untersuchung wurde durch die Anwendung weiterer Primer auf bisher nicht betrachtete



Bereiche des S/MARs ausgedehnt. Das I-Fragment, welches am 5'-Ende liegt, ist nach den SIDD-Berechnungen sehr stark destabilisiert. In den *in vivo* Analysen dieser Region unter Verwendung des „A“-Primer-Sets konnte diese Vorhersage bestätigt werden. Es traten spezifischer Fragmente durch mehrfache Modifizierung einer AT-reichen Box (TTTCTTTGAAAATTATATAATTGATTACTTTATT) auf. Außerdem

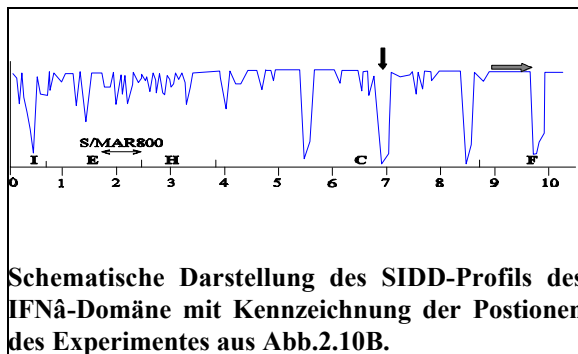


gab es reaktive T-Nukleotide in einer TTATAA-Sequenz und in einem T<sub>23</sub>-Abschnitt.

Bei der Untersuchung des Gegenstrangs mit vom IFN $\alpha$ -Gen weg gerichteten Primern, konnten dagegen nur wenige Modifizierungsstellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente mit dem in den pTZ18R-Vektor eingebauten I-Fragment zeigten das gleiche Ergebnis wie mit der DNA lebender Zellen. Ein ähnliches Bild ergab sich im S/MAR800. Der Gegenstrang der in Abb.2.10A untersuchten Region erwies sich nur im Bereich der BUR an einer Stelle KMnO<sub>4</sub>-sensitiv. Ein derart komplexes Fragmentmuster, wie in Abb.2.10A beobachtet, konnte auf diesem DNA-Strang nicht nachgewiesen werden. Außerdem ergaben sich hier interessanterweise auch Unterschiede zum Modifizierungsmuster an Plasmid-DNA *in vitro*. In der LM-PCR nach KMnO<sub>4</sub>-Modifizierung von pCI-Plasmid wurden mit diesen Primern wesentlich mehr Fragmente amplifiziert als *in vivo*.

Weitere Analysen folgten im destabilisierten Peak bei Position 1500 und bei 2000. In beiden Experimenten konnte Einzelstrangcharakter nachgewiesen werden. Ein Vergleich zu den Modifizierungsstellen *in vitro* ergab an diesen Stellen keine Unterschiede.

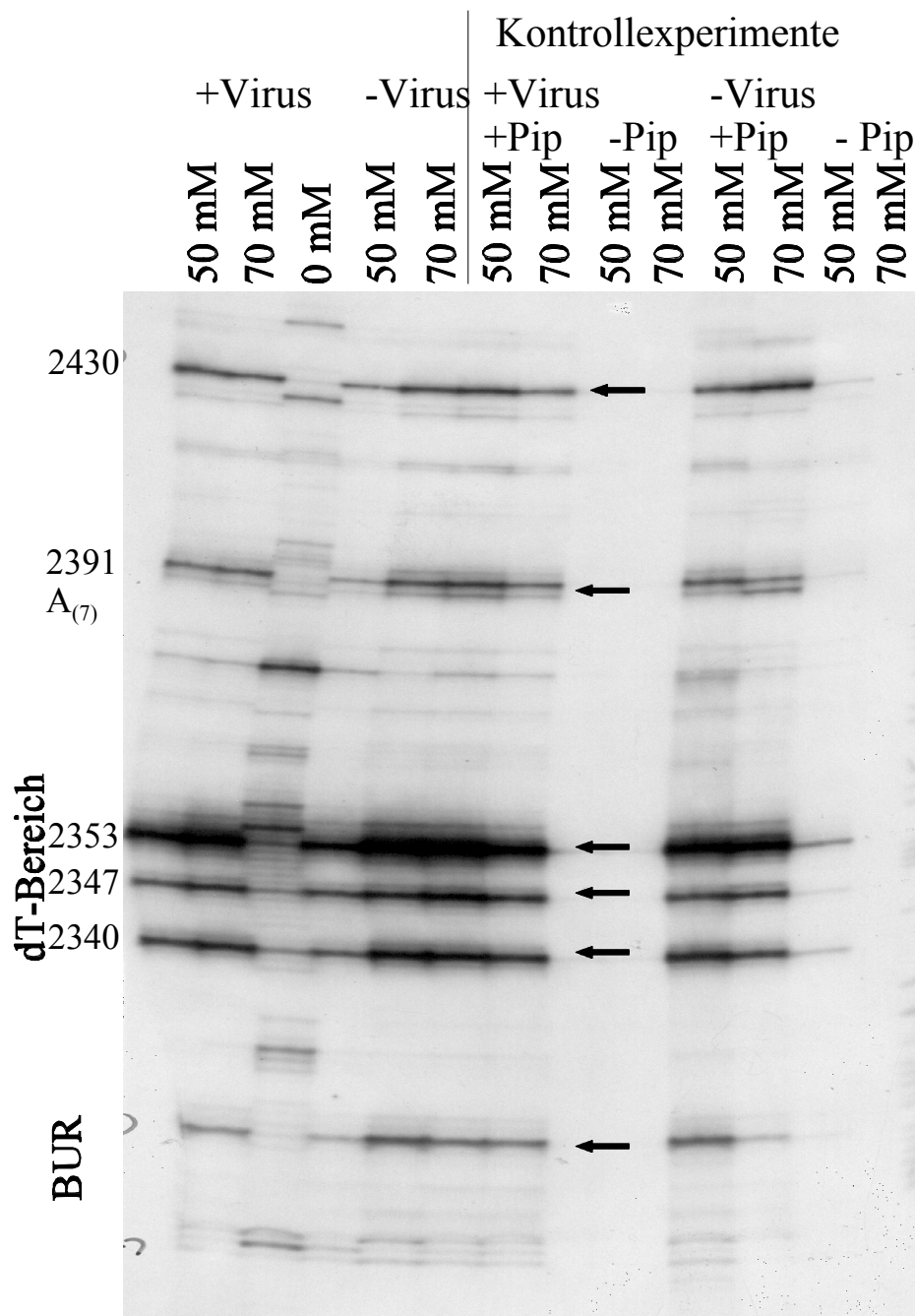
Das SIDD-Profil der IFN $\alpha$ -Domäne zeigt neben den Regionen des S/MARs einige scharf begrenzte destabilisierte Stellen, die in Bereichen liegen, welche keine S/MAR-Bindung auf-



weisen. Ein solcher „Peak“ liegt z.B. an Position 7000. Hier wurde ebenfalls der Einzelstrang-Charakter getestet (Die Position ist in der nebenstehenden Zeichnung gekennzeichnet). Das Ergebnis ist in Abb.2.10B dargestellt. In das Muster ist der Start des DNA-Peaks eingetragen. Die hohe Anzahl an Fragmenten zwischen 6985 und 7050 korreliert exakt mit der Spitze der destabilisierten Region und enthält interes-

santerweise ein von Nakagomi et al. identifiziertes, für die Bindung des S/MAR-spezifischen Proteins SATB1 notwendiges ATC-Sequenz-Motiv (Nakagomi et al., 1994; deBelle et al., 1998; siehe auch Abb.2.10B). Innerhalb dieser sehr AT-reichen Sequenz findet man viele PolyA- und PolyT-Motive. Außerdem fallen zahlreiche AT-Wiederholungen auf. Die Modifizierungsstellen bei Position 6871, 6907 und 6921 sind ebenso durch hohen AT-Gehalt gekennzeichnet. Wie bereits im Bereich des S/MAR800 gibt es auch hier keine Veränderungen des Fragmentmusters nach dem Anschalten des IFN $\alpha$ -Gens durch Infektion mit Sendai-Viren. Auch an den anderen prominenten Einzelpeaks (Position 4200, 5600 und 8500) wurden Analysen durchgeführt. Dabei konnte das dargelegte Ergebnis bestätigt werden.

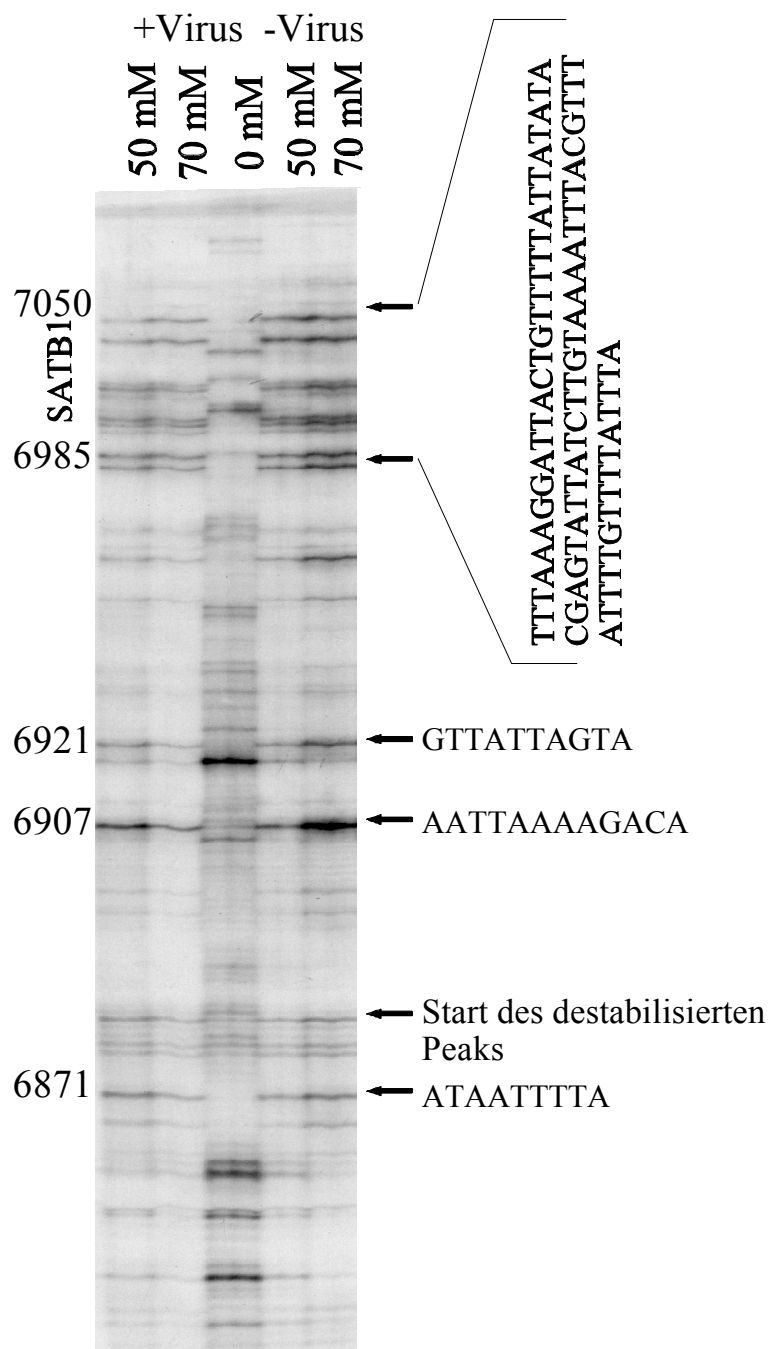




**Abb.2.10A:** Sequenziergel nach der LM-PCR mit *in vivo* modifizierter genomischer DNA aus MG63-Zellen. Die konfluent auf großen Platten wachsenden Zellen wurden nach einem Waschschrift mit Reaktionspuffer bedeckt. Die Zellen wurden mit steigenden Mengen an  $\text{KMnO}_4$  inkubiert. Über den Spuren des Gels in der Abbildung sind die dabei verwendeten Konzentrationen angegeben. Nach zwei Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Der zugegebene Stop-Puffer bewirkte eine gleichzeitige Lysis der Zellen. Nach Isolierung der DNA (nach herkömmlichen Protokoll unter sanfter Zentrifugation nach der Fällung und in den Kontrollexperimenten bei sehr hohen Drehzahlen) wurde die DNA mit Piperidin geschnitten. Bei den Proben der Spuren 6 - 13 erfolgte die Piperidin-Inkubation nur wenn angegeben (+/-Pip). Die LM-PCR erfolgte nach dem in Kap.4.7.2. beschriebenen Protokoll unter Verwendung der „D“-Primer, welche an das S/MAR800 binden.

In den Spuren „+Virus“ wurden MG63-Zellen verwendet, die zuvor mit Sendai-Virus infiziert worden waren, um die Genexpression des IFN $\alpha$ -Gens zu induzieren.

Die  $\text{KMnO}_4$ -spezifischen Fragmente sind mit Pfeilen und den Positionsangaben bezogen auf die IFN $\alpha$ -Domäne gekennzeichnet. Außerdem sind Angaben zu den modifizierten Sequenzmotiven eingetragen.



**Abb.2.10B:** Sequenziergel nach der LM-PCR mit *in vivo* mit  $\text{KMnO}_4$  modifizierter genomischer DNA von MG63-Zellen. Es wurden Primer „H“ verwendet, die an die Sequenz der destabilisierten Region an Position 7000 der IFN $\alpha$ -Domäne binden. Die Angaben zu experimentellen Daten und zum Layout der Abbildung entsprechen denen aus Abb.2.10A.

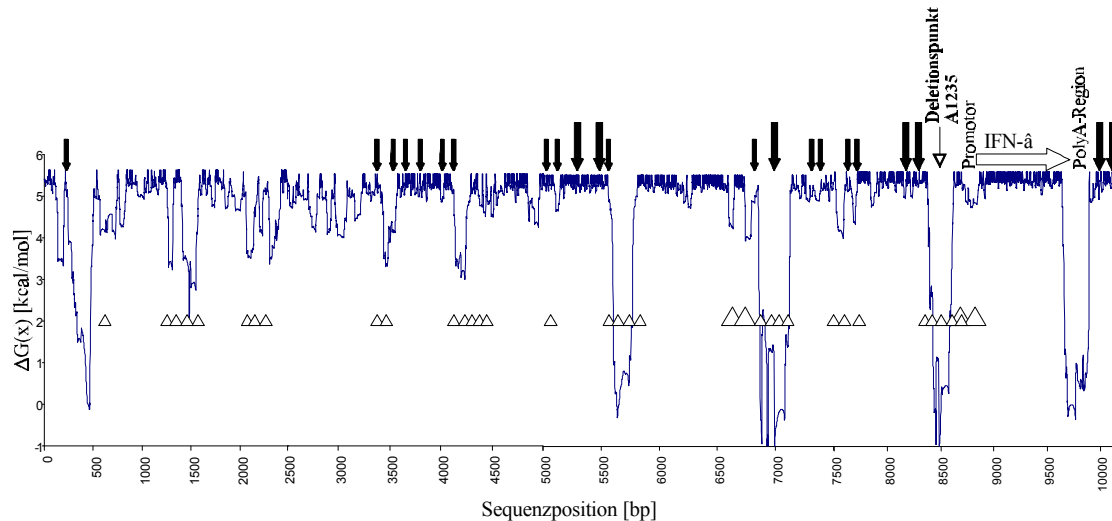
Mittels  $\text{KMnO}_4$ -„footprinting“ konnte erstmalig nachgewiesen werden, daß S/MAR-Elemente in lebenden Zellen in einzelsträngiger Konformation auftreten. Die Vorhersagen des SIDD-Profil werden durch diese Analysen bestätigt. Es wurde außerdem demonstriert, daß auch innerhalb einer Gendomäne Strangtrennung an destabilisierten Sequenzabschnitten auftritt. Die Aktivierung der Genexpression hat keinen Einfluß auf die DNA-Struktur in den untersuchten Bereichen.

### **2.1.5. Identifizierung DNase I-hypersensitiver Stellen innerhalb der IFN- $\alpha$ -Domäne**

In den letzten Kapiteln konnte demonstriert werden, daß in lebenden Zellen eine hohe Tendenz spezifischer DNA-Bereiche zur Einzelstrang-Bildung vorliegt. Solche DNA-Bereiche sind vor allen Dingen die an der Chromatin-Organisation beteiligten S/MAR-Elemente am Rand von strukturellen Domänen. Aber auch innerhalb der Domäne gibt es lokal begrenzte Regionen, in denen Einzelstrang-Konformation nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu den S/MARs ist hier nur eine kurze Sequenz betroffen. In Verbindung mit der offenen Chromatin-Struktur liegt es nahe, hier nach besonderer Sensitivität für DNase I zu suchen. Daher wurde in einer im Rahmen dieses Projektes konzipierten Diplomarbeit, die von Ellen Ernst durchgeführt wurde, nach DNase I hypersensitiven Stellen innerhalb der IFN- $\alpha$ -Domäne gesucht und eine Korrelation mit dem SIDD-Profil durchgeführt (Ernst, 2000).

In dieser Diplomarbeit wurden eine Reihe von Southern-Blot-Analysen mit indirekter Endmarkierung zur Identifizierung der DNase I-Schnittstellen durchgeführt. Es konnten zwei Typen von relevanten Stellen gefunden werden. Zum einen gab es eine große Anzahl von Schnittstellen endogener Nukleasen, die bereits ohne Zugabe exogener Nuklease, nach Permeabilisierung der Zellen und Suspension in Reaktionspuffer, auftraten. Daneben konnten zusätzlich DNase I-Schnittstellen nachgewiesen werden, die erst nach Zugabe höherer Mengen an Nuklease sichtbar wurden. In Abb.2.11 sind die ermittelten Daten aus dieser Arbeit im SIDD-Profil zusammenfassend dargestellt.

Als Schlußfolgerung aus diesen Experimenten konnte festgehalten werden, daß es eine gute Korrelation der DNase-sensitiven Regionen zu den Peaks im SIDD-Profil und damit auch zu der schon beschriebenen Tendenz zur Einzelsträngigkeit gibt. Außerdem konnten interessante Korrelationen der DNase I-Hypersensitivität zur Poly-Adenylierungsregion des IFN-Gens und zu einem von Strissel et al. (1998) identifizierten Deletions-Bruchpunkt in der DNA von Leukämiepatienten nachgewiesen werden.

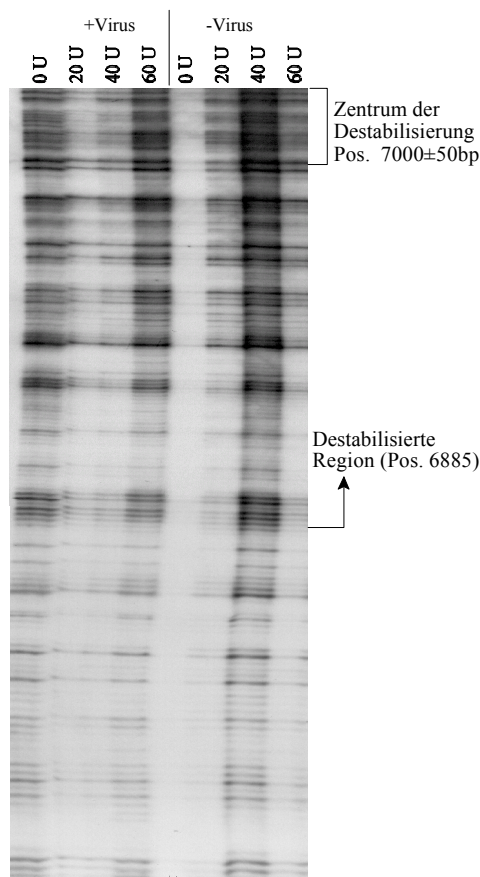


**Abb.2.11:** SIDD-Profil des 5'-Bereiches der IFN- $\alpha$ -Domäne mit Eintragungen zu DNase I-Sensitivität (Ernst, 2000)

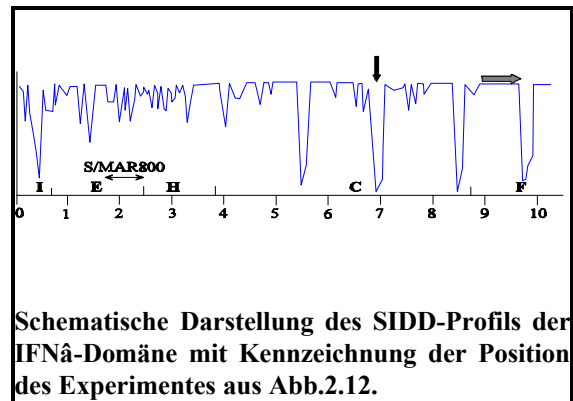
Die Stellen mit Sensitivität für endogene Nukleasen sind unterhalb des Graphen mit  $\Delta$ -Symbolen dargestellt. Die Schnittstellen exogen zugeführter DNase I sind durch senkrechte Pfeile markiert. Die Größe der Symbole ist ein Maß für die Stärke der Hypersensitivität. Die Position des IFN-Gens ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Daten wurden durch LM-PCR-Versuche mit Primer-Sets an den prominenten destabilisierten Peaks der Interferon- $\alpha$ -Domäne erweitert. In Abb.2.12 ist das Ergebnis beispielhaft für die hypersensitive Stelle an Position 7000 dargestellt. Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen Proben vor und nach Induktion der Genexpression des IFN- $\alpha$ -Gens. Wie auch schon bei den  $\text{KMnO}_4$ -Experimenten gibt es keine Veränderungen nach dem Anschalten der Transkription des Gens. Eine deutliche Veränderung des Fragmentmusters mit zunehmender DNase I-Konzentration ist nicht erkennbar, was aber auf Aktivität der endogenen Nukleasen zurückgehen kann. Vor Beginn der destabilisierten Region im unteren Bereiches des Sequenziergels sind die Signale schwächer als im oberen Teil.

Die LM-PCR-Analysen von DNase I modifizierten Zellen wurden an verschiedenen Stellen innerhalb der Domäne durchgeführt. Ein interessantes Bild lieferte die Analyse des IFN- $\alpha$ -Gens. Hier gab es nicht wie bei der Untersuchung anderer Bereiche eine hohe Anzahl einzelner Fragmente, die mit steigender Nuklease-Konzentration stärker wurden, sondern es konnten große Abschnitte ohne Fragmente mit dazwischen liegenden einzelnen Signalen beobachtet werden.



**Abb.2.12:** Sequenziergel der LM-PCR-Proben von genomischer DNA aus MG63-Zellen, welche mit DNase I modifiziert wurden. Die Zellen wurden mit NP40 permeabilisiert und mit steigenden Konzentrationen DNase I inkubiert. Die verwendeten DNase-Mengen sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Es wurden Zellen ohne Interferon-Expression mit solchen, durch Sendai-Virus-Infektion induzierten, verglichen.



Dieses Bild entspricht dem eines typischen DNA se I-„footprints“, wie er durch Protein-Bindung an die DNA hervorgerufen wird. Auch bei der Untersuchung des S/MAR800 mit vom Gen weg gerichteten Primern konnte ein auf Proteinbindung hinweisendes „footprinting“-Muster beobachtet werden. Das Ergebnis an diesem DNA-Strang wird durch die bereits in Kap.2.1.4.3. beschriebene Diskrepanz zwischen dem KMnO<sub>4</sub>-Modifizierungsmuster *in vivo* und *in vitro*, welche durch vorhandene Proteinbindung *in vivo* erklärbar ist, unterstützt.

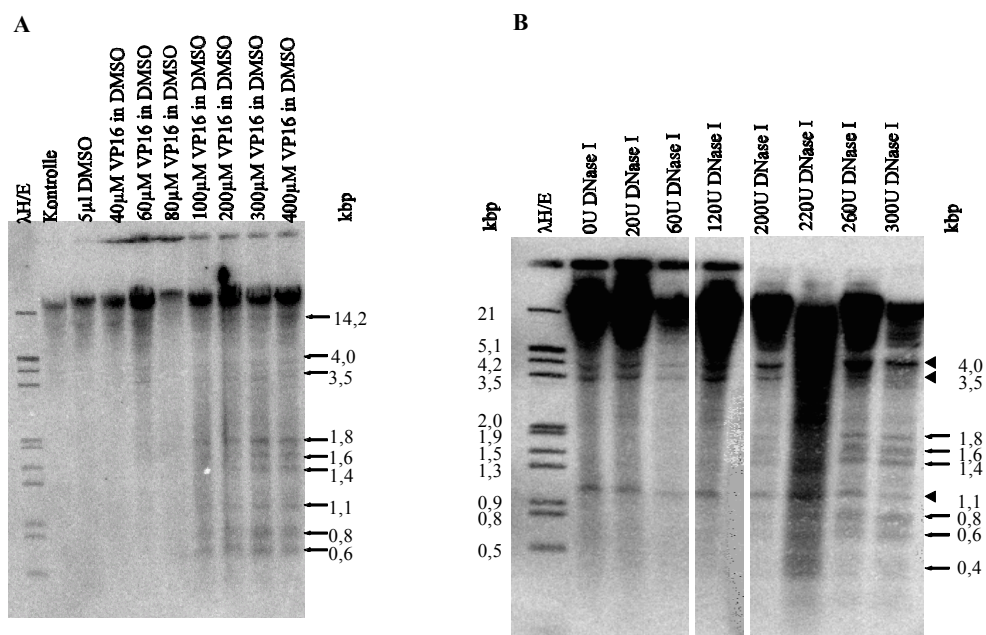
Mit den Experimenten zur Untersuchung der DNase I-Sensitivität an verschiedenen Stellen der IFN $\alpha$ -Domäne wurde ein weiterer

Aspekt der Chromatin-Struktur dieses Bereiches - nämlich die Zugänglichkeit der DNA *in vivo* - analysiert. Um die Analysen zu vervollständigen wurden in einem letzten Abschnitt die Orte der Aktivität Konformations-beeinflussender Enzyme, der Topoisomerasen, lokalisiert.

### 2.1.6. Identifizierung von Topoisomerase II-Schnittstellen innerhalb der IFN $\alpha$ -Domäne

Ein gemeinsames Merkmal von S/MAR-Elementen ist das Vorhandensein von Bindungsstellen für Topoisomerase II. Da diese Enzyme einen wichtigen Einfluß auf die Konformation der DNA in lebenden Zellen ausüben, sollte untersucht werden, an welchen Stellen innerhalb der Domäne sie aktiv sind. Zur Identifizierung der während der topologischen Veränderungen eingeführten Schnittstellen wurde der Topoisomerase II-Inhibitor VP16 eingesetzt. Diese Chemikalie hemmt das Enzym, nachdem die DNA geschnitten wurde. Lysiert man die Zellen in diesem Zustand,

bleiben die Brüche erhalten und können identifiziert werden. Der Nachweis der Topoisomerase II-Schnittstellen muß an Zellen in logarithmischer Wachstumsphase durchgeführt werden, da das Enzym nach Erreichen der Konfluenz einer Kultur abgeschaltet wird (Valkov, 2000). Die Untersuchungen erfolgten mittels Southern-Blot und indirekter Endmarkierung. In Abb.2.13 ist das Ergebnis eines solchen Experimentes im Vergleich zu einer DNase I-Analyse dargestellt. Beide Southern-Blots untersuchen den 5'-Bereich der Domäne. Mit zunehmender Konzentration des modifizierenden Agens erscheinen bei beiden Versuchen spezifische Signale. Die Vermessung der Fragmentgrößen ergibt eine exakt identische Positionierung von DNase I und Topoisomerase II-Erkennungsstellen. Diese Beobachtung konnte bei der Untersuchung anderer Bereiche der Domäne bestätigt werden. Die Lokalisierung der Topoisomerase II-Schnittstellen zeigte, daß diese Enzyme nicht hauptsächlich innerhalb des 5'-S/MAR-Elementes der Domäne sondern an dessen Rand aktiv sind. Wie die DNase I-sensitiven Regionen korrelieren die Positionen ihrer Aktivität mit destabilisierten Bereichen.



**Abb.2.13:** Southern-Blot nach Modifizierung von 2<sub>4</sub>-Zellen mit Topoisomerase II-Inhibitor VP16 im Vergleich zu DNase I (Diplomarbeit E.Ernst)

A. Für die Mappierung der Topoisomerase II-Schnittstellen wurden Zellen einer mittleren Platte in logarithmischer Wachstumsphase für 30 min mit steigenden Mengen von VP16 inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Zellen und die Aufarbeitung der modifizierten genomischen DNA nach herkömmlichen Protokollen. Für den Southern-Blot wurde die DNA mit EcoRV geschnitten. Der Nachweis erfolgte durch Hybridisierung einer radioaktiv markierten EcoRV-Bsu36I-Sonde.

Die nachweisbaren Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die ermittelte Größe ist angegeben.

B. Die Durchführung der Mappierung der DNase I-Schnittstellen ist der Diplomarbeit von E.Ernst zu entnehmen. Für den Southern -Blot erfolgte ein Restriktionsverdau mit EcoRV, für die Hybridisierung wurde die EcoRV-Bsu36I-Sonde verwendet. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Fragmente gehen auf DNaseI-Schnittstellen zurück, die mit Dreiecken markierten entstehen durch die Aktivität endogener Nukleasen.

Bei einem Experimenten zur Untersuchung der Topoisomerase II-Schnittstellen gelang der Nachweis, daß die in den DNase I-Analysen beobachtete Aktivität endogener Nukleasen durch Stress-Einwirkung auf die Zellen induziert wird. Führt man das in Abb.2.13 gezeigte Experiment zur Lokalisierung der Topoisomerase I-Schnittstellen unter Entzug von FCS durch, einem Vorgang der typischerweise zur Induktion von Apoptose führt und daher Stress für die Zelle bedeutet, treten im Southern-Blot die schon bekannten Fragmente, die aus der Aktivität der endogenen Nukleasen entstehen, auf.

Mit der Identifizierung der Topoisomerase II-Schnittstellen und dem Abgleich mit den SIDD-Berechnungen wurden die Chromatin-Struktur-Analysen der IFN- $\alpha$ -Domäne vervollständigt. Zusammenfassend kann folgendes festgehalten werden:

Innerhalb der untersuchten genomischen Domäne gibt es DNA-Bereiche, die in Einzelstrangkongformation vorliegen. Besonders ausgeprägt ist die Strangtrennung im Bereich des 5'flankierenden S/MAR-Elementes. Es konnten an mehreren Stellen dieser Region komplexe Modifizierungsmuster der Einzelstrang-spezifischen Chemikalie  $\text{KMnO}_4$  nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der BAA-Modifizierungen erwiesen sich als etwas weniger sensitiv. An der untersuchten Stelle im S/MAR800 konnten jedoch die gleichen einzelsträngigen Bereiche nachgewiesen werden, wie unter Verwendung von  $\text{KMnO}_4$ . Die einzelsträngigen Bereiche sind bis auf eine Ausnahme mit denen *in vitro* an Plasmid-DNA detektierten identisch. Im S/MAR800, einem Teilfragment des analysierten Grenzelementes, gab es an einem DNA Strang *in vivo* ein wesentlich schwächeres Modifizierungsmuster als an Plasmid-DNA. Dieses auf Proteinbindung hinweisende Ergebnis wurde durch die DNase I-Analysen bekräftigt, bei denen auf dieser Sequenz typische „footprints“ mit breiten, nicht-sensitiven Fenstern und dazwischenliegenden, hypersensitiven Nukleotiden nachgewiesen werden konnten. Innerhalb der Gendomäne wurde an den scharf begrenzten, einzeln stehenden Destabilisierungspeaks lokale  $\text{KMnO}_4$ -Sensitivität gemessen. Die DNase I-Analysen bestätigten, daß diese Peaks hypersensitive Bereiche mit besonders offener DNA-Struktur darstellen. An allen DNase I-hypersensitiven Stellen konnte außerdem Topoisomerase II-Aktivität nachgewiesen werden..

Die Untersuchungen zur S1 Nuklease-Sensitivität *in vitro* zeigten, daß die Vorhersagen des SIDD-Profiles zur Destabilisierung der DNA mit den tatsächlich auftretenden Konformationen innerhalb von S/MAR-Elementen gut übereinstimmen. Die Strangtrennung kann aber durch ausgeprägte Sekundärstrukturen lokal verschoben sein. Unter Benutzung des SIDD-Profiles ist man somit in der Lage, die Position Struktur- und Regulations-relevanter Bereiche in einer DNA-Sequenz vorherzusagen. Die Einbeziehung weiterer Vorhersage-Faktoren und -Methoden ermöglicht die Verifizierung der Berechnungen.

Die Ausweitung der dargelegten Analysen auf ähnliche genomische Domänen wird in Folgeprojekten angestrebt. Für die Vorbereitung dieser Arbeiten wurde eine Beteiligung im Human

Genomprojekt bei der Sequenzierung des Interferon Typ I-Clusters initiiert. Die dafür durchgeführten Experimente sind in den folgenden Kapiteln zusammengefaßt.

## **2.2. Identifizierung und Untersuchung von für Sequenzierarbeiten an Chromosom 9 p21-22 geeigneten Bakterienklonen**

Zu Beginn der vorgelegten Doktorarbeit waren die Sequenzen der kodierenden Regionen der funktionellen Gene des Interferon Typ I-Clusters bekannt. Erste umgreifende Analysen zum Aufbau dieses Bereiches waren 1994 von Diaz et al. veröffentlicht worden. Ihnen gelang es, die Anordnung der IFN Typ I-Gene ganzheitlich darzustellen. Die für die Analyse der intergen gelegenen S/MAR-Elemente notwendigen Sequenzinformation waren nicht vorhanden.

Um in weiterführenden Projekten die Untersuchung zur Struktur der S/MAR-Elemente, zu vorhandenen Homologien oder Konformations-bestimmenden Sequenzeigenschaften sowie die Möglichkeiten der Vorhersage ausbauen zu können, war eine Entschlüsselung der gesamten Sequenz dieses Chromosomabschnittes eine wichtige Voraussetzung. Daher war im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung an den vorbereitenden Arbeiten zur Sequenzierung von Chromosom 9 vorgesehen.

Für die Sequenzierung großer DNA-Bereiche werden BAC- oder PAC-Vektoren mit genomischen Inserts aus der Zielregion verwendet. Das benutzte Verfahren beruht auf der Herstellung einer sogenannten „Shotgun“-Bank. Dafür wird die DNA der BAC- oder PAC-Vektoren mittels Ultraschall zerkleinert und die zufällig entstehenden Fragmente in Sequenzierplasmide kloniert. Das Ergebnis ist eine genomische Bank, in der alle denkbaren ca. 600 bp großen Fragmente des Ausgangsvektors vertreten sind. Die Sequenzierung erfolgt dann unter Verwendung von Primern, die rechts und links vom Insert an die Vektorsequenz des Sequenzierplasmids binden. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, daß im Gegensatz zum „Primer-Walking“ nur ein Primerpaar für die Sequenzierung notwendig ist. Der gesamte Prozeß kann durch Roboter-Einsatz sehr effektiv gestaltet werden. Die Durchführung dieser Methode bringt allerdings auch einige Anforderungen an das Ausgangsmaterial mit sich. So sollten die verwendeten BAC- oder PAC-Vektoren möglichst klein und das genomische Insert möglichst groß sein, um den Anteil an Vektor-Fragment tragenden „Shotgun“-Plasmiden so klein wie möglich zu halten. Außerdem sollten bei der Sequenzierung einer Region die BAC- oder PAC-Vektoren mit den am wenigsten überlappenden genomischen Inserts verwendet werden, um zwei- oder dreifache Sequenzierung eines Bereiches zu vermeiden. Die Auswahl und Analyse der verwendeten Vektoren ist daher eine wichtige Teilaufgabe bei der Vorbereitung der eigentlichen Sequenzierungsarbeiten.

Das Ausgangsmaterial für die Suche nach geeigneten BAC- oder PAC-Vektoren für die Bearbeitung des IFN Typ I-Genclusters waren Cosmid-Klone aus einer Chromosom 9 spezifischen Cosmid-Bank (F. Olopade; Chicago USA). Für die Identifizierung dieser Klone hatte man PCR



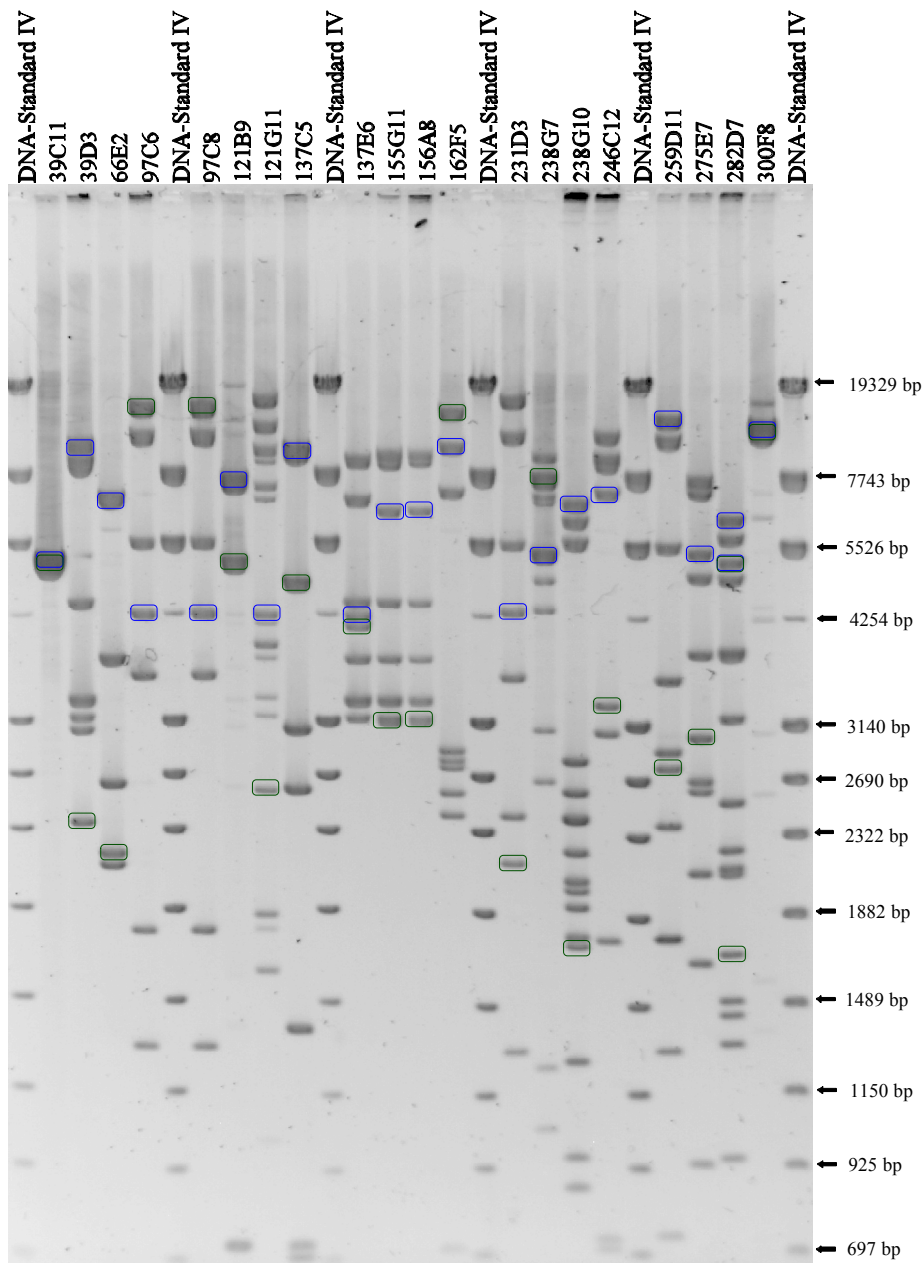
generierte Sonden verwendet, die spezifisch für Type I IFN-Gene waren (Diaz, pers. Mitteilung). 38 dieser Klone wurden uns für die Analysen zur Verfügung gestellt.

### 2.2.1. Analyse der Chromosom 9 spezifischen Cosmid-Klone

Zur Untersuchung großer genomischer Inserts von Cosmid-, BAC- und PAC-Vektoren stehen Restriktionsanalysen, PCR und Southern-Analysen zur Verfügung. Erstere geben Auskunft über mögliche Überlappungen der Insertfragmente durch Identifizierung identischer Restriktionsfragmentmuster. Die in Agarosegelen aufgetrennten Restriktionsfragmente können in Southern-Blot-Experimenten zur Lokalisierung der Randfragmente des Inserts oder zur Bestimmung von Fragmenten mit bereits bekannten Sequenzabschnitten (einzelne Gene oder Teile davon) benutzt werden. Durch PCR-Assays können ebenfalls spezifische Sequenzabschnitte lokalisiert werden. Zu den Chromosom 9 spezifischen Cosmiden erhielten wir nur wenige Informationen über die Position der Inserts innerhalb des Genclusters. Da ein Teil dieser Vektoren für das Screening nach PAC- und BAC-Vektoren verwendet werden sollte, war eine Identifizierung der genomischen Inserts erforderlich. Nach der präparativen Isolierung der DNA wurden dafür alle Klone mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI, NcoI, XhoI, NotI, SalI und SfiI verdaut und die resultierenden Fragmentmuster im Agarosegel dargestellt („Fingerprinting“). Unter Benutzung des Computerprogramms *Multi-Analyst 1.1* konnten die Fragmentgrößen exakt bestimmt werden. In Abb.2.14 ist beispielhaft ein NcoI-Fingerprint eines Teils der Cosmid-Klone zur besseren Veranschaulichung der Arbeitsweise dargestellt. Bereits durch bloße Betrachtung des Restriktionsfragmentmusters erkennt man, daß die Klone 97C6 und 97C8 sowie die Klone 155G11 und 156A8 identisch sind. Eine angeschlossene Southern-Blot Analyse zur Identifizierung der Randfragmente der Inserts konnte weitere Informationen liefern. In Abb.2.14 sind die identifizierten Randfragmente in das Fragmentmuster eingetragen. Man sieht, daß Klon 137E6, der vom Restriktionsmuster teilweise identisch zu 155G11 und 156A8 ist, sowohl rechts als auch links ein anderes Randfragment besitzt. Da alle drei Klone etwa die gleiche Insertgröße von ca. 32 kbp aufweisen, scheint das Insert von 137E6 etwas versetzt zu sein. Die Klone 97C6, 97C8, 121G11, 137E6 und 231D2 besitzen ein Randfragment der gleichen Größe. Möglicherweise beginnt ihr Insert also auf einer Seite an der gleichen Position. Besonders Klon 231D3 besitzt große Ähnlichkeit mit 97C6 und 97C8.

Die Auswertung solcher Informationen ist in der letzten Phase der Sequenzierarbeiten von Bedeutung, da dann Sequenzlücken (gaps) geschlossen werden müssen.

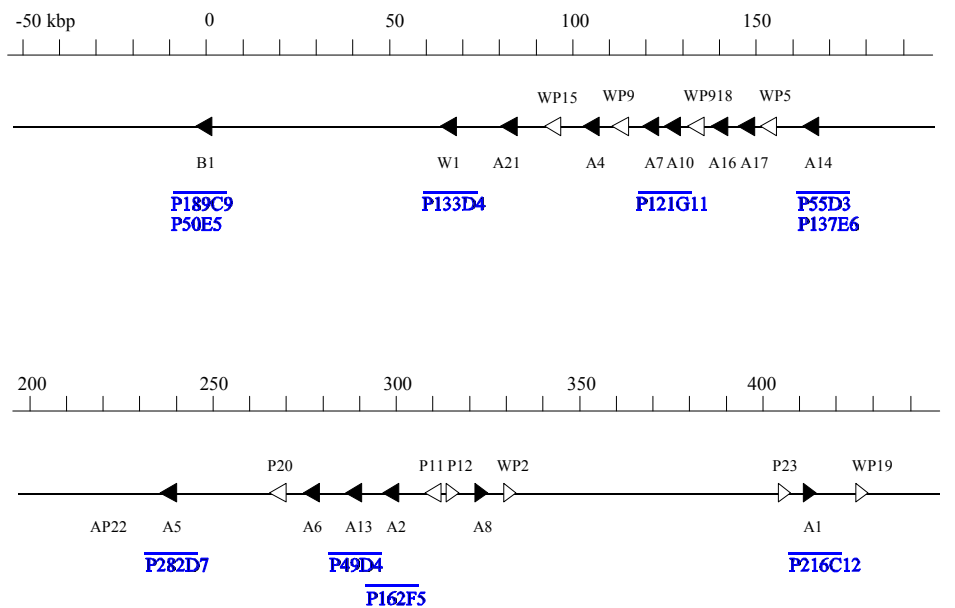
In Zusammenarbeit mit Dr. Gabriele Nordsieck (AG Genomanalyse) wurden zusätzlich zu diesen Analysen die Vektor-flankierenden Bereiche der Inserts sequenziert und mit bekannten Sequenzen verglichen. Außerdem wurden PCR-Analysen mit spezifischen Primern für einzelne IFN-Gene durchgeführt.



**Abb.2.14:** NcoI-Fingerprint von Chromosom 9 spezifischen Cosmide-Klonen.

Die 1µg DNA wurde mit NcoI verdaut und die resultierenden Fragmente über Nacht im Agarosegel aufgetrennt. Nach der Färbung wurde das Gel fotografiert und stand zur Fragmentanalyse zur Verfügung. Die Fragmente wurden auf eine Nylonmembran geblottet und konnten dann mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden. In der Abbildung sind die so identifizierten Randfragmente der genomischen Inserts eingetragen (grün oder blau umkreiste Banden). Die Fragmentgrößen der Standardspuren sind an der Seite des Gels eingetragen.

Durch Anwendung der Gesamtheit dieser Methoden konnten auf einigen Cosmiden einzelne Gene identifiziert werden und so die Position der Cosmidinserts innerhalb des Genclusters bestimmt werden. Auf diese Weise entstand eine erste sogenannte „physical map“ der Region (Abb.2.15).



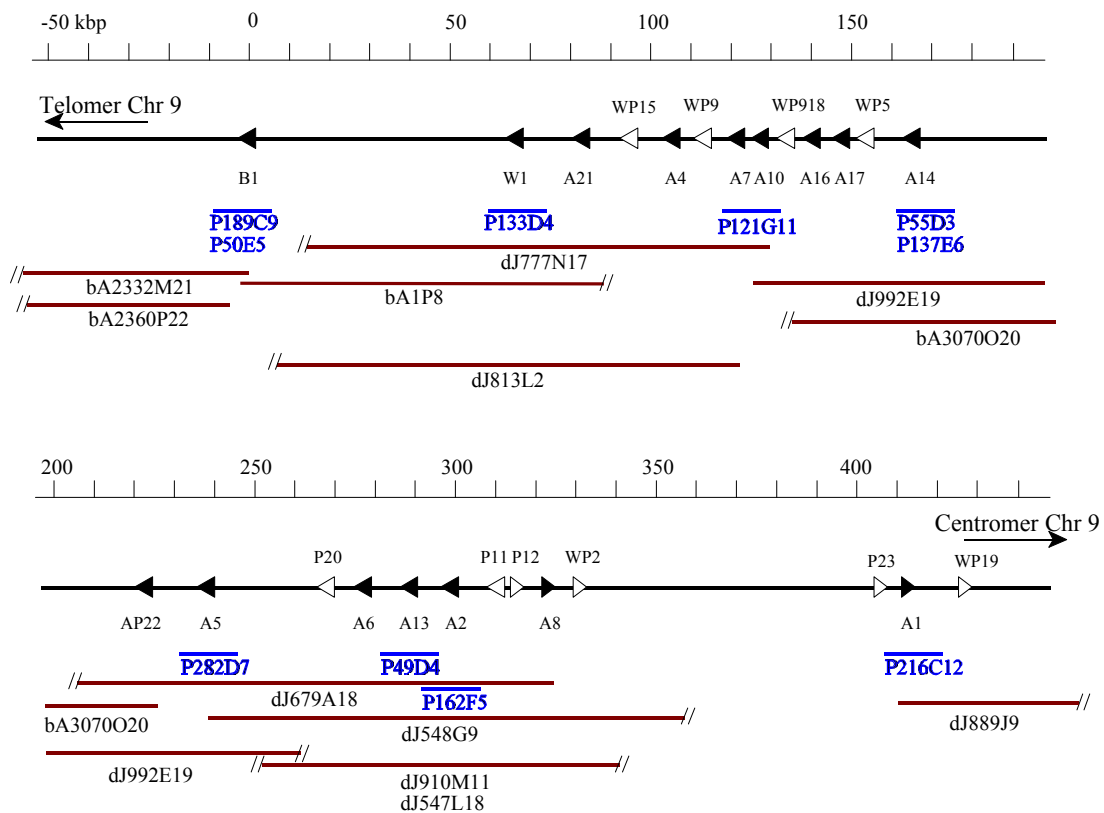
**Abb.2.15:** Physikalische Karte des humanen Interferonclusters nach Mappierung der Cosmidklone. Der IFN-Gencluster ist schematisch dargestellt. Die Dreiecke kennzeichnen die Lage der einzelnen Gene (schwarze Dreiecke sind funktionelle Gene; weiße Dreiecke sind Pseudogene). Darüber ist eine Größenskala eingezeichnet. Die Lage der Cosmide mit identifizierten genomischen Inserts ist in blau eingetragen. Die Grenzen der Inserts sind noch nicht exakt bestimmbar.

### 2.2.2. Untersuchung Chromosom 9 spezifischer BAC- und PAC-Klone

Cosmide sind wegen ihren relativ kurzen Inserts von 30-35 kbp für die Sequenzierarbeiten nicht optimal geeignet. Sie können aber sehr gut dafür verwendet werden, nach BAC- oder PAC-Klonen, welche entsprechende genomische Fragmente tragen, zu suchen. Diese können bis zu 300 kbp groß sein. Die Klone P216C12, P189C9, P55D3 und P49D4 wurden daher, ausgehend von den gesammelten Informationen, ausgewählt, um in einer PAC-Bank (RPC11,3-5) nach PAC-Klonen zu suchen, die genomische Inserts aus der uns interessierenden Region enthalten. Das Screening wurde vom Ressourcenzentrum des DHGP in Heidelberg vorgenommen. Die Cosmid-Klone wurden so ausgewählt, daß die produzierten Sonden für die Hybridisierung der PAC-Bank-Membranen etwa gleichmäßig über den Gencluster verteilt lagen. Die resultierenden 34 PAC-Klone wurden uns zur Untersuchung zur Verfügung gestellt.

In einem zweiten Arbeitsansatz zur Identifizierung relevanter Klone wurde die BAC-Endsequenz-Datenbank des TIGR (The Institute of Genome Research; <http://www.tigr.org>) mit uns bekannten Sequenzen nach möglichen Übereinstimmungen abgesucht. Bei 6 BAC-Klonen aus der RPCR-11- und der CIT-HSP-Bank konnten passende Sequenzen identifiziert werden. Auch diese Klone wurden uns von den betreffenden Instituten zur Verfügung gestellt und in die Analysen einbezogen. (Eine Liste der bearbeiteten Cosmide, BACs und PACs und soweit

vorhanden Verweise auf bereits vorhandene Sequenzinformationen befindet sich im Anhang auf S.126f.)



**Abb.2.16:** Physikalische Karte von Chromosom 9 q21-22

In blau sind Cosmid-Klone, in rot BAC- und PAC-Klone eingetragen. Bei den BACs und PACs entspricht die Länge der Linie der Länge der genomischen Inserts, wobei unterbrochene Ende noch nicht identifizierte Endpunkte darstellen.

Wie bereits bei den Cosmidklonen wurden auch hier Fingerprint-, PCR- und Southern-Analysen zur Identifizierung und Positionierung der genomischen Inserts durchgeführt. Das Ergebnis zeigt die erweiterte physikalische Karte des Bereiches in Abb.2.16.

Die Klone und dazugehörigen Daten wurden an das Sanger-Zentrum in Großbritannien weitergegeben, wo eine Koordinierung der Sequenzierarbeiten an Chromosom 9 stattfindet. Hier wurden zusätzliche BAC-Klone in die Karte aufgenommen, die für die Sequenzierung am geeignetsten gelegenen Klone bestimmt und an die Sequenzierzentren verteilt.

Die endgültige physikalische Karte, die im Sanger-Zentrum erstellt wurde kann im Internet eingesehen werden (<http://www.sanger.ac.uk>).

---

### **2.2.3. Heutiger Stand der Arbeiten**

Die Sequenzierarbeiten an Chromosom 9 q21-22 werden am Sanger-Zentrum und an der GBF (AG Genomanalyse) durchgeführt. Für alle ausgewählten Klone liegen inzwischen „working drafts“ - erste Arbeitsentwürfe, bestehend aus vielen einzelnen 3-5 kbp großen ungeordneten „Contigs“, vor. Es gelang uns, den bekannten Sequenzbereich um das IFN $\alpha$ 10-Gen anhand dieser ersten Daten auszubauen. Große Fortschritte sind auch bei der Entschlüsselung des großen intergenen Bereiches zwischen IFN $\alpha$  und IFN $\gamma$  1 zu verzeichnen. Mit zunehmend größer werdenden bekannten Regionen werden nun S/MAR-Vorhersageanalysen durchgeführt, die Aufschluß über die Domänenstruktur des Genclusters geben werden und Voraussetzung für spätere biochemische Strukturanalysen dieser Region sind.

### 3. Diskussion

S/MAR-Elemente spielen bei der Organisation des Chromatins eine entscheidende Rolle als Verankerungspunkte der DNA an die Kernmatrix. Die ersten Experimente, die zur Identifizierung dieser Elemente führten, wurden bereits 1984 (Mirkovitch et al.) veröffentlicht. In einer Reihe von Studien konnte diesen DNA-Bereichen eine Anzahl möglicher Funktionen während Transkriptions- und Replikationsprozessen zugeordnet werden (Bode et al., 1995; Boulikas et al., 1995). Die Bindung an die Kernmatrix ist das entscheidende Kriterium, welches die gefundenen Effekte ermöglicht. Diese Assoziation führt zur Ausbildung der Domänenstruktur der DNA. Die S/MARs fungieren dabei nicht nur als simple Aufhänger, sondern sie vermitteln als Begrenzungselemente der Gendomänen abschirmende Wirkungen auf die Expression des innerhalb der Domäne liegenden Gens und schützen als Isolatoren vor Einflüssen des umgebenden Chromatins. In anderen Veröffentlichungen wurde ihre Wirkung als cis-agierende Elemente bei der Verstärkung der Transkription benachbarter Gene demonstriert (Schübeler et al., 1996; Bode et al., 1998). Außerdem gibt es vermehrt Hinweise, daß sie als Orte der Replikationsinitiation eine Rolle spielen können (Boulikas, 1996; Baiker et al., 2000). Parallel zu DNA-Untersuchungen wurden S/MAR-bindende Proteine identifiziert, die wichtige Komponenten der Kernmatrix sind. Neben ihrer DNA-Bindungseigenschaft weisen sie häufig Protein-Protein-Bindungsdomänen auf, mit denen sie Wechselwirkungen zu Komponenten der Transkriptionsmaschinerie und des Splice-Apparates aufbauen (Nayler et al., 1998; Weinghardt et al., 1999). Für einige Transkriptionsfaktoren konnte eine Signalsequenz identifiziert werden, die eine Lokalisierung an der Kernmatrix determiniert (NMTS-„nuclear matrix targeting signal“, Zeng et al., 1997). Eine RNA-Bindungskapazität wurde für andere Matrix-spezifische Proteine nachgewiesen (Fackelmayer et al., 1994). Ausgehend von diesen Befunden betrachtet man die Kernmatrix heute als eine dynamische Plattform, die nicht nur das starre formgebende Gerüst darstellt, sondern an der viele nukleäre Prozesse ablaufen. Die S/MAR-Elemente spielen dabei als Vermittler der DNA-Matrix-Interaktion eine entscheidende Rolle. Die Untersuchung grundlegender Konformationseigenschaften der S/MARs, die die Matrix-Bindung ermöglichen, kann grundsätzlich zum Verständnis ihrer vielfältigen Funktionen beitragen.

#### 3.1. S1 Nuklease-Sensitivität von Plasmiden mit eingebauten S/MAR-Elementen *in vitro*

In Kapitel 2.1.2. wurden die Ergebnisse einer umfassenden Untersuchung zur S1 Nuklease-Sensitivität von zwei Modell-S/MAR-Elementen demonstriert. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeiten war der Abgleich der biochemischen Daten mit den Vorhersagen des SIDD-Profiles. Benham konnte 1993 zeigen, daß bestimmte Abschnitte einer DNA-Sequenz in einer destabilisierten Konformation vorliegen, d.h. ein hohes Potential zur Strangtrennung aufweisen. In späteren Veröffentlichungen konnte demonstriert werden, daß in S/MAR-Elementen gehäuft Regionen

mit starker Destabilisierung der Doppel-Helix-Struktur auftreten (Benham et al., 1997). Für einen kleinen Bereich des S/MAR800, der „base-unpairig“-Region, wurde unter Verwendung der Einzelstrang-spezifischen Chemikalie BAA schon früher Einzelstrangcharakter *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Bode und Maass, 1988; Bode et al., 1992). Die erweiterten biochemischen Analysen mit S1 Nuklease in der vorgelegten Arbeit sollten die Konformation eines größeren Bereiches untersuchen. Dabei konnten Analysen an Bereichen des Vektorrückgrates als Einstieg dienen. Die Stabilität der DNA-Konformation von Plasmiden ist in Publikationen von Kowalski et al., 1984 und 1988 sowie Sheflin und Kowalski, 1984 beschrieben worden.

### 3.1.1. S1 Nuklease Sensitivität des pTZ18R-Vektorrückgrates

Das SIDD-Profil zur Vorhersage einzelsträngiger Bereiche resultiert aus statistisch-mechanischen Berechnungen zur freien Enthalpie der Doppelstrang-Bildung eines DNA-Stranges ausgehend von Sequenzinformationen (siehe Einleitung Kap.1.2.3.1). Bei einfachen Vektoren mit einem Replikationsstartpunkt und einem Resistenz-vermittelnden Gen ohne jegliches Insert weist es bei einer standardisierten, negativen superhelikalen Spannung an charakteristischen Stellen Destabilisierungen der DNA-Doppelhelix auf (Benham, 1997). Besonders auffällig ist dabei der Peak in der Terminatorregion des Ampicillin-Resistenzgens. Weitere lokal instabile Bereiche befinden sich in der Promotor-Sequenz und im „Origin of Replication“. Erste biochemische Untersuchung zur Existenz lokaler Strangtrennung in superhelikalen Plasmiden wurden von Kowalski et al. (1988) veröffentlicht. Das Auftreten der Einzelstrang-Bereiche des von den Autoren untersuchten pBR322-Plasmids war absolut abhängig von der Superhelizität des Moleküls. Die Hierarchie der Nuklease-sensitiven Stellen reflektiert laut Kowalski die Hierarchie in der Freien Energie, die für die Aufwindung AT-reicher Bereiche aufgebracht werden muß. Diese Beobachtung wird durch Benhams Vorhersage, nach der die stärksten Peaks im SIDD-Profil die Orte der primären Strang-Trennung darstellen, bestätigt. In späteren Veröffentlichungen wurde die hohe Tendenz zur Einzelsträngigkeit in Bereichen mit „Origin of Replication“-Funktion gezeigt (Kowalski et al., 1989).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zur S1 Nuklease-Sensitivität an S/MAR-tragenden Plasmiden wurden an einem Derivat des pUC18-Plasmids durchgeführt. Der verwendete Klonierungs-Vektor pTZ18R enthält neben dem lacZ-Gen mit der „multiple cloning site“ einen zusätzlichen fl-Replikationsstartpunkt. Die S1 Nuklease-Analysen konnten für das Vektorrückgrat zeigen, daß ein ausgeprägter einzelsträngiger Bereich im Ampicillin-Terminator lokalisiert ist (Abb.2.5A und 2.5B). Außerdem gibt es bei sehr hohen Konzentrationen der Nuklease Schnittstellen in der Nähe des „ColE1“-Replikationsstartpunktes.

Bei allen Untersuchungen war die S1 Nuklease-Sensitivität deutlich in Plasmid-Molekülen unter negativer superhelikaler Spannung zu beobachten, während in linearen Molekülen nur

bei den höchsten Enzymkonzentrationen eine schwache Aktivität detektierbar war (Abb.2.2). Nach Einfügen eines Restriktionsschnittes wird das Plasmid entspannt. Das Gleichgewicht zwischen doppel- und einzelsträngiger DNA-Konformation ist in diesem Fall sehr weit zur Seite des Doppelstrangs verschoben (vgl. Kap.1.2.3.1 zur Superhelizität von DNA-Molekülen). Die S1 Nuklease wird, wenn auch erst bei sehr viel höheren Enzymmengen, zuerst die Bereiche mit der geringsten Stabilität schneiden, bevor es zu einem vollständigen Verdau des gesamten Moleküls kommt. Daher treten auch an der linearen Plasmid-Form bei sehr hohen Enzymkonzentrationen dieselben Abbauprodukte wie an superhelikalen Molekülen auf.

Beim Vergleich der Vorhersagen des SIDD-Profiles mit den Analysen der S1 Nuklease-Sensitivität des Vektorrückgrates gab es eine Abweichung an den Replikationsstartpunkten. Der „f1-Origin of Replication“ weist im SIDD-Profil eine sehr starke Destabilisierung auf. In den S1 Nuklease-Experimenten konnten aber stets nur Einzelsträngigkeit im ColE1- und nicht im f1-Startpunkt nachgewiesen werden.

Die Analysen der pTZE18R-Sequenz mit dem Sequenzanalyse-Programm *gcg* zeigte, daß über die gesamte Sequenz des Vektors „Inverted Repeat“-Motive verteilt sind. Die besondere S1 Nuklease-Sensitivität am Terminator des Resistenzgens war von Lilley 1980 mit dem Vorhandensein der Motive in dieser Region erklärt worden. Welche Sekundärstrukturen tatsächlich ausgebildet werden, ist nicht zuverlässig vorher bestimmbar. (An „Inverted Repeat“-Motiven bilden sich an DNA „cruciform“-Strukturen aus gegenüberliegenden Haarnadeln.) Möglicherweise können aber weitere Sequenzmerkmale die Sekundärstrukturbildung an bestimmten „Inverted Repeats“ stabilisieren und beeinflussen. In Frage kämen dafür z.B. die in der Terminator-Region gefundenen „curved“-Motive. 1984 analysierten Sheflin und Kowalski das Plasmid pM2 und konnten Übereinstimmung der einzelstrangspezifischen „Mung Bean“-Nuklease-Aktivität mit den Stellen möglicher Haarnadelstrukturen im Ampicillin-Terminator feststellen. In ihrer Diskussion verwiesen sie auf eine alternative Sekundärstruktur für „Inverted Repeat“-Motive - eine viersträngige Helix. Diese von Lim und Mazanov (1978) beschriebene Struktur benötigt für ihre Bildung „curved“-DNA-Motive zwischen den „Inverted Repeats“ um eine Interaktion der Einzelhaarnadeln zu erlauben. An diesen gebogenen DNA-Abschnitten wäre ebenfalls eine Sensitivität gegenüber einzelstrangspezifischen Nukleasen zu erwarten. Das gemeinsame Vorkommen beider Motive könnte die detektierte S1 Nuklease-Sensitivität in diesem Bereich erklären.

### **3.1.2. S1 Nuklease Sensitivität des S/MAR800 im pCI-Plasmids**

Wird ein S/MAR-Element in einen Vektor eingebaut, kommt es zu Veränderungen der Peaks im SIDD-Profil. In dem inserierten Fragment treten eine Anzahl destabilisierter Abschnitte über eine Länge von mindestens 300 bp auf. Die Konzentrierung des Strangtrennungspotentials auf diesen



Vektorbereich führt zu einer Verkleinerung der Peaks in den ursprünglichen Regionen. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Möglichkeit, das Destabilisierungspotential eines neu in den Ursprungsvektor eingebauten Fragmentes abzuschätzen. Je mehr die Peaks an den internen Bereichen verschwinden, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit für eine Strangtrennung im S/MAR-Fragment, und gleichzeitig ist eine umso höhere Bindungsstärke zu erwarten (Benham et al., 1997).

Beim pCI-Plasmid, welches das aus der humanen Interferon- $\alpha$ -Domäne stammende S/MAR800 trägt, stimmen die Berechnungen des SIDD-Profiles gut mit den experimentellen Daten überein. Im stark destabilisierten S/MAR-Element konnten viele S1-Nuklease Schnittstellen identifiziert werden (Abb.2.5B). Die hohe Tendenz zur Strangtrennung, die bei den Untersuchungen von Bode et al. (1992) an einem Teil des S/MARs dieses Plasmids nachgewiesen wurde, konnte für das gesamte Element gezeigt werden. Dabei ist der als „core unwinding“ Region bezeichnete Sequenzabschnitt derjenige Bereich, an der die Einzelstrangbildung eines destabilisierten Peaks ihren Ursprung hat. Diese Region korreliert mit der Spitze einer destabilisierten Umgebung. Die beiden innerhalb des S/MAR-Fragments lokalisierten „Inverted Repeat“-Motive liegen ebenfalls genau an der Spitze von zwei destabilisierten Peaks. Die Existenz solcher Sequenz-Besonderheiten kann den Einzelstrangcharakter, der durch den hohen AT-Gehalt begünstigt wird, noch verstärken. Gleiches gilt für „curved“-DNA-Motive, deren gehäuftes Auftreten für viele S/MAR-Elemente charakteristisch ist. Innerhalb des S/MAR800 liegt eines dieser Motive an der Spitze eines destabilisierten Bereiches (Pos.530; Abb.2.5B).

Die Größe der destabilisierten Peaks scheint auf den ersten Blick nicht immer eine Indiz dafür zu sein, an welcher Stelle die Öffnung des Moleküls beginnt. So ist die Destabilisierung am Ampicillin-Terminator in pCI-Vektor im Vergleich zur Destabilisierung des S/MAR-Elementes schwächer ausgeprägt. Der Southern-Blot zeigt aber eindeutig, daß die Terminator-Region bei geringeren S1 Nuklease-Konzentrationen geschnitten wird als das S/MAR-Fragment (Abb.2.2). Das 2,1 kbp-Fragment, welches beim Schnitt im Ampicillin-Terminator entsteht, tritt bei deutlich niedrigeren Nuklease-Konzentrationen auf als das 0,95 kbp-Fragment aus dem Schnitt innerhalb des S/MARs. Wahrscheinlich ist die Vorhersage für die primäre Strangtrennung durchaus korrekt. Die Öffnung des DNA-Stranges unter superhelikaler Spannung ist die Voraussetzung für die Ausbildung der besonderen Sekundärstruktur des Vektorrückgrates. Durch deren stabile Ausprägung könnte die S1 Nuklease-Sensitivität des AT-reichen S/MAR-Fragmentes nachträglich moduliert werden.

Bei der Lokalisierung der Schnittstellen der Nuklease konnte die Beobachtung gemacht werden, daß in ATC-Sequenzen nicht so häufig geschnitten wird wie erwartet. Nakagomi et al. (1994) isolierten das S/MAR-bindende Protein SATB1 und konnten dessen Assoziation mit AT-

reichen, einzelsträngigen Bereichen zeigen. Die Sequenzen, mit denen SATB1 interagiert, zeichnen sich durch Abschnitte, in denen über mehr als 20 bp nur A-, T- oder C-Nukleotide (bzw. A-, T- oder G-Nukleotide auf dem Gegenstrang) vorkommen, aus. Erwartungsgemäß sollten sich an solchen Sequenzen S1 Nuklease Schnittstellen nachweisen lassen. Es konnte jedoch beobachtet werden, daß die ATC-Abschnitte stets nur am Rand geschnitten wurden. Innerhalb der Motive gab es meist gar keine S1 Nuklease Schnittstellen. Ein mögliche Erklärung wäre, daß die Proteinbindung selbst an der Ausprägung der Einzelsträngigkeit mitwirkt. In diesem Falle würde man erst nach Proteinbindung Strangtrennung nachweisen können. Derartige Untersuchungen könnten mit Hilfe von Formaldehyd-„crosslinking“ Experimenten vorgenommen werden, bei denen die Protein-DNA-Assoziationen im Mittelpunkt stehen.

Die Auswertung der Sequenzmotive der identifizierten S1-Nuklease-Schnittstellen ergab, daß äußerst häufig kurze direkte Sequenzwiederholungen („Direct Repeats“) von TA-, TC-, TG- oder AG-Motiven erkannt werden. Alternierende Purin-Pyrimidin-Wiederholungen (TA- oder TG-„Repeats“) wurden in früheren Arbeiten von Singleton et al. (1982, 1984) als Sequenzen beschrieben, welche unter superhelikalem Stress in Z-Konformation umklappen. Der Übergang zwischen B- und Z-DNA-Bereichen, d.h. von einer rechts- in eine linksgängige Doppelhelix, ist sensitiv für Einzelstrang-spezifische Nukleasen. Die in den S/MAR-Elementen gefundenen Sequenzwiederholungen sind sicherlich zu kurz, um Z-DNA-Konformation einzunehmen. Es ist jedoch denkbar, daß diese Regionen eine etwas instabile B-DNA-Konformation aufweisen und daher stark zu Strangtrennung neigen. Benachbarte „Repeat“-Motive können außerdem zur Ausprägung von „Slippage“-Strukturen führen und so S1-Nuklease-Sensitivität hervorrufen.

### **3.1.3. S1 Nuklease-Sensitivität des S/MAR-Elementes im pTZE2.2-Vektors**

Das Plasmid pTZE2.2 beinhaltet ein S/MAR-Fragment besonders hoher Bindungsstärke. Es wurde aus der intergenen Region zwischen den IFN $\alpha$ 1- und IFN $\gamma$ P19-Genen isoliert. Nach neusten Sequenzvergleichen enthält das S/MAR die PolyA-Region des IFN $\alpha$ 1-Gens (S. Götze; pers. Mitteilung). Bei der SIDD-Profil-Berechnung des Plasmids zeigte sich, daß innerhalb des S/MAR-Fragmentes zwei deutliche destabilisierte Peaks erscheinen. Die Destabilisierung im Vektorrückgrat tritt wesentlich zurück.

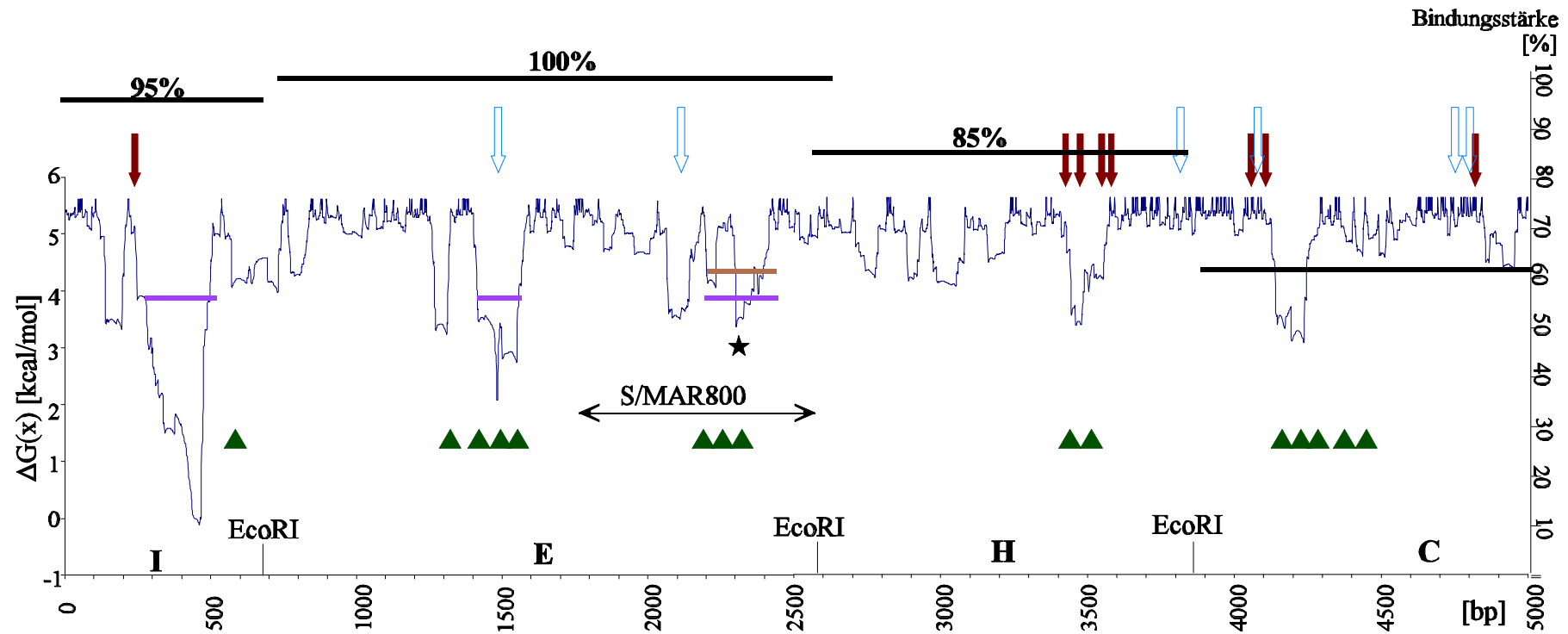
Der Abgleich der S1 Nuklease-Daten mit dem SIDD-Berechnungen zeigte, daß einige Abweichungen der detektierten zu den vorhergesagten Einzelstrang-Regionen auftreten. Dies wird besonders im S/MAR-Fragment deutlich. Die Region um Position 1000, in welcher die höchste S1 Nuklease-Sensitivität nachweisbar war, sollte nach den Berechnungen stabil sein. In der leicht destabilisierten Region um Position 400 wurden in den LM-PCR-Analysen einige S1-Erkennungsstellen lokalisiert, wogegen die stark destabilisierte Region an Position 1800 dagegen nur zwei S1-sensitive Stellen am Rand des Peaks zeigte. Da aus früheren Arbeiten bekannt war,

daß Einzelstrang-spezifische Nukleasen besondere DNA-Sekundärstrukturen in superhelikaler DNA erkennen und schneiden, wurde die Sequenz auf das Vorhandensein von „Inverted Repeat“ Motiven abgesucht (Lilley, 1980). Es konnte gezeigt werden, daß gerade in der Region der stärksten S1 Nuklease-Reaktivität viele potentielle „Haarnadel“-Strukturen lokalisiert sind. Bei pTZE2.2-Plasmid wurden zwei S1 Nuklease-Schnittstellen an der Basis bzw. im Loop einer „cruciform“-Struktur identifiziert (Abb.2.5A).

Die Lokalisation der „Inverted Repeat“-Motive kann ein Grund für eine Verschiebung der vorhergesagten Einzelsträngigkeit sein. Lilley (1980) spricht sogar von einer Stabilisierung der Sekundärstrukturen durch superhelikale Spannung. Die Öffnung des DNA-Stranges unter negativer Superhelizität erfolgt nur an einer begrenzten Anzahl von Stellen. Der AT-Gehalt spielt bei der Bestimmung dieser Position eine wesentliche Rolle, aber die Experimente demonstrieren deutlich, daß auch andere Faktoren einen Einfluß nehmen können. Auch die schon in der Ampicillin-Terminatorregion identifizierten Motive für „curved“ DNA finden sich innerhalb der S/MAR-Fragmente. Im pTZE2.2-Plasmid gibt es solche Sequenzen nicht nur in den destabilisierten Peaks sondern sie kolokalisieren auch mit den S1 Nuklease-sensitiven „Inverted Repeat“-Motiven.

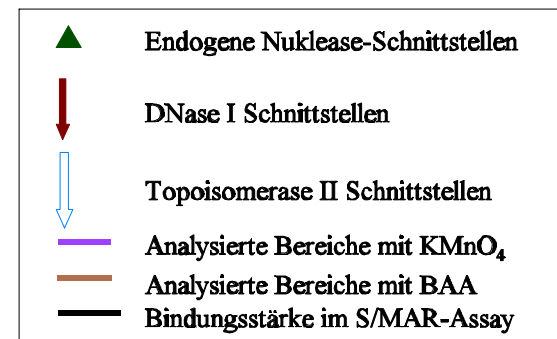
T. Boulikas hat in einer Reihe von Veröffentlichungen S/MAR-Elemente auf vorhandene Sequenzmerkmale untersucht (1992 - 1995). Dabei konnte er z.B. eine Häufung von Bindungsmotiven von Homeodomänen-Protein in S/MARs nachweisen und regte so eine Diskussion über einen möglichen Einfluß der S/MARs auf entwicklungsbestimmende Prozesse an. Außerdem zeigte er, daß in diesen Elementen DNA-Motive, die zu einer gebogenen „curved“-DNA-Konformation führen, konzentriert auftreten. Das gehäufte Auftreten invertierter Sequenzwiederholungen konnte nur bei einem Teil der untersuchten S/MAR-Elemente festgestellt werden. Das S/MAR800 im pCI-Plasmid würde man z.B. in der „Inverted Repeat“-armen Klasse einordnen, da es innerhalb dieses Elementes nur zwei potentielle „Haarnadel“-Strukturen gibt. Ausgehend von den Erkenntnissen von Boulikas et al., wurden in das SIDD-Profil der untersuchten Plasmide zusätzlich die Homeoprotein-Bindungsmotive eingetragen. Das vollständige Bild der beiden Plasmide zeigt, daß die Homeoprotein-Motive durchaus in den Regionen größerer Instabilität konzentriert sind. Allerdings finden sich im Vektorrückgrat ebenfalls mehrere dieser Motive.

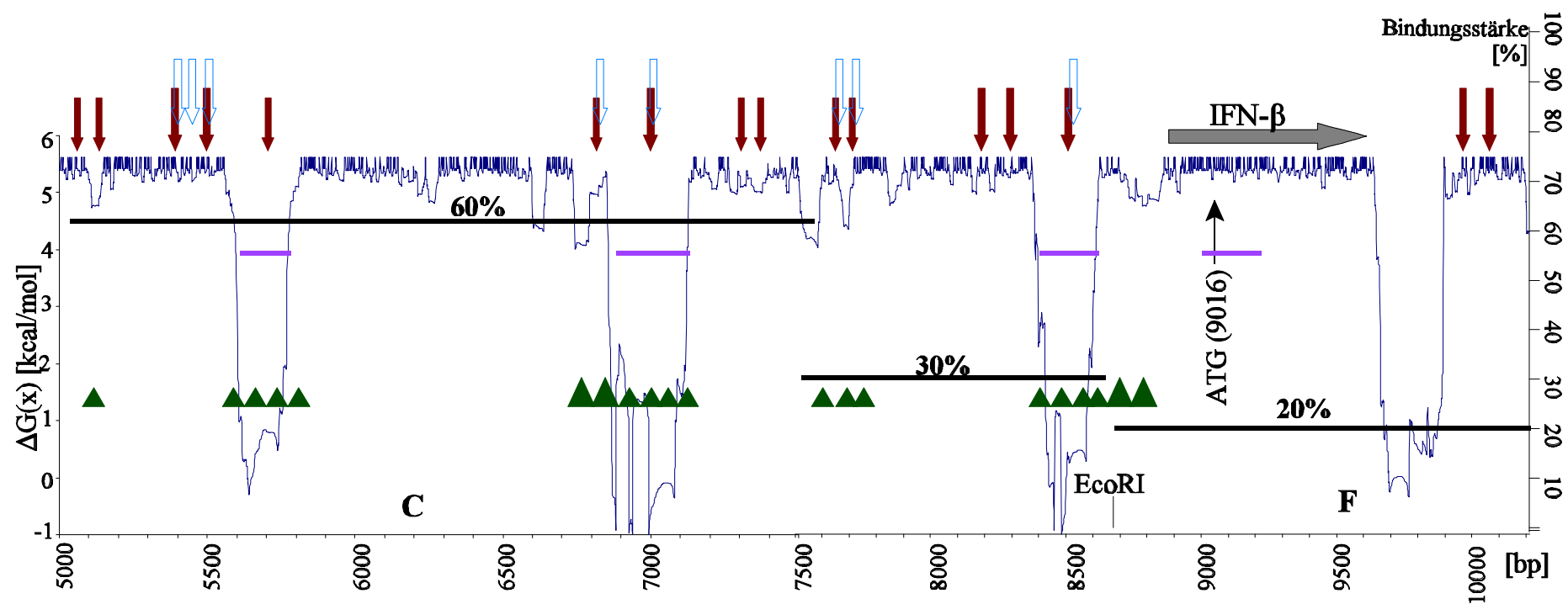
Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Analysen der S1 Nuklease-Sensitivität die Vorhersagen zur Strangtrennung in den meisten Regionen bestätigen. Die in der vorgelegten Arbeit gefundene Korrelation der S1-Schnittstellen mit „Inverted Repeat“-Motiven ist ein Hinweis, daß die Ausbildung von besonderen Sekundärstrukturen aufgrund vorhandener Sequenzcharakteristika für eine Verschiebung des errechneten Ortes der Strangtrennung verantwortlich sein kann.



**Abb.3.1:** Zusammenfassende Übersicht über die experimentellen Daten an der Interferon- $\beta$ -Domäne und Korrelation mit den SIDD-Profil.

Das SIDD-Profil entspricht dem in Abb.1.4 vorgestellten Bild. Die Positionen der BAA- und  $\text{KMnO}_4$ -Untersuchungen sind markiert. Außerdem sind die identifizierten Schnittstellen endogener Nukleasen, von DNase I und der Topoisomerasen II eingetragen. Die von Mielke et al. (1990) ermittelten Bindungsaktivitäten der EcoRI-Restriktionsfragmente sind an einer zweiten Y-Achse aufgetragen. Die Lage des S/MAR800 mit der "core unwinding"-Region sowie des IFN $\beta$ -Gens mit dem Transkriptionsstart sind gekennzeichnet.





### 3.2. Einzelstrang-Konformation der DNA *in vivo*

Die Experimente zum Nachweis der Einzelstrang-Konformation innerhalb der IFN $\alpha$ -Domäne sind Teil einer umfassenden Chromatinstrukturanalyse. Die Untersuchungen zur Strangtrennung wurden an 2<sub>4</sub>-Zellen oder Zellen der MG63-Zelllinie unter Verwendung der Chemikalien BAA und KMnO<sub>4</sub> an verschiedenen Positionen innerhalb der Domäne vorgenommen. Es folgten Mappingsstudien zur Lokalisierung von Nuklease-sensitiven Bereichen und Topoisomerase II-Schnittstellen. In Abb.3.1 sind die Ergebnisse dieser Arbeiten zusammenfassend anhand des SIDD-Profiles der Gendomäne dargestellt. Zur Veranschaulichung der S/MAR-Charakteristika sind die von Mielke et al. (1990) ermittelten Bindungseigenschaften der EcoRI-Restriktionsfragmente mit eingezeichnet. Die Abbildung kann als Orientierungshilfe bei der Diskussion der komplexen Daten aus unterschiedlichen „footprinting“-Analysen dienen.

#### 3.2.1. Nachweis des Einzelstrangcharakters der DNA in S/MAR-Elementen *in vitro* und *in vivo* mit BAA

Die Verwendung von BAA basiert auf der Veröffentlichung eines Protokolls für *in vitro*-Experimente von Kohwi-Shigematsu et al. (1988). Bode et al. (1992) konnten unter Verwendung dieser Chemikalie erstmals Strangtrennung in S/MAR nachweisen und eine Verbindung dieser Eigenschaft zu den Fähigkeiten dieser Elemente, an die Kernmatrix zu binden, herstellen.

Bei der Anwendung von BAA an lebenden Zellen gibt es jedoch einige Nachteile, die zu beachten sind. So müssen die Zellen für die Modifizierung aufgrund der Größe des BAA-Moleküls vor der Behandlung permeabilisiert werden, um ein Eindringen zu ermöglichen. Es zeigte sich, daß für die spezifische Modifizierung sehr hohe Konzentrationen an BAA erforderlich waren. Offensichtlich wurden viele Moleküle auf dem Weg in den Zellkern durch nukleophile Akzeptormoleküle abgefangen. Die dadurch und durch die Permeabilisierung selbst hervorgerufenen Veränderungen in der Zelle, die das Versuchsergebnis beeinflussen, können nicht eingeschätzt werden. Trotz dieser Einschränkungen gelang ein erster Nachweis von Einzelsträngigkeit von S/MARs in lebenden Zellen (Abb.2.6). Ein Vergleich zu dem entstehenden Fragmentmuster von Plasmid-DNA ergab deutliche Unterschiede. Die untersuchte S/MAR800-Region war *in vivo* im Bereich der früher detektierten „base unpairig“-Region sensitiv für BAA. Diese Reaktivität war auf den kurzen Bereich der identifizierten „core unwinding“ Region beschränkt. Bei den Analysen des in Plasmid eingebauten S/MAR800-Fragmentes *in vitro* ergab sich eine wesentlich breitere einzelsträngige Region. In Plasmid-Molekülen unter negativer superhelikaler Spannung waren zusätzlich das 3' von der „core unwinding“ Region liegende TC-reiche Motiv sowie ein T7- und ein ATATAT-Motiv gegen BAA sensitiv. Als Schlußfolgerung aus dieser Beobachtung ergibt sich, daß *in vivo* durch Proteinbindung und die in der Zelle herrschenden Ionenbedingungen der Einzelstrangcharakter auf eine schmale Region begrenzt ist. Da die Plasmid DNA frei

von derartigen Einflüssen vorliegt, erfolgt die Strangtrennung dort ausschließlich nach Stabilitätskriterien der Doppelhelixbindung. Denkbar wäre außerdem ein Unterschied in der Superhelizität dieser Region zwischen beiden Versuchsansätzen. Die negative superhelikale Spannung von Plasmid-DNA ist abhängig von den Synthespezifikationen des verwendeten bakteriellen Systems. In eukaryontischen Zellen hat die Superhelizität eines entsprechenden genomischen Bereiches andere Ursachen und kann daher andere Werte aufweisen, was zu Veränderungen der Breite der Strangtrennungsregion führen kann. Die Sensitivität des verwendeten „footprinting“-Reagenz zum Nachweis der Einzelsträngigkeit spielt ebenfalls eine Rolle. So ist bekannt, daß Osmiumtetroxid sehr sensitiv auf Destabilisierungen der Basenpaarung reagiert, wohingegen die S1 Nuklease erst dann schneidet, wenn tatsächlich eine stabile Strangtrennung vorliegt. Bromacetaldehyd und das später verwendete Kaliumpermanganat reiht sich zwischen OsO<sub>4</sub> und S1 Nuklease ein.

Ein weiterer Aspekt bei der Auswertung der BAA-Modifikationsergebnisse ist die auffällige Übereinstimmung des *in vivo* Fragmentmusters zu dem denaturierten Plasmid *in vitro*. In letzterem sollten alle Zielnukleotide modifiziert werden und der Schnitt mit Piperidin zur Entstehung sehr vieler kleiner Fragmente führen. Eine PCR-Amplifikation sollte gar nicht oder maximal bei solchen BAA-Konzentrationen möglich sein, bei der die zugeführte Chemikalien-Menge nicht ausreicht, um mit sämtlichen Nukleotiden zu reagieren. Die Abbildung 2.6 zeigt jedoch bei der höchsten verwendeten Konzentration auch an denaturiertem Plasmid amplifizierte Fragmente. Diese BAA-Menge stellt möglicherweise die minimale Menge dar, welche erforderlich ist, um eine präferentielle Reaktion in einer sehr langen, einzelsträngigen Sequenz beobachten zu können. Warum es in denaturierter DNA überhaupt zu präferentiellen Reaktionen kommt, ist nicht leicht verständlich. Eine teilweise Renaturierung benachbarter Plasmidbereiche und die damit verbundene bevorzugte Modifizierung an instabilen Sequenzen ist denkbar. Möglicherweise kommt es aber auch einfach durch die besonders hohe Konzentration reaktiver Nukleotide (alle A- und C-Nukleotide) zu häufigen Modifizierungen im betroffenen Bereich, was zu Generierung einer genügend großen Anzahl an Ausgangsfragmenten für die PCR-Amplifizierung sichtbarer DNA-Mengen führt. *In vivo* könnten während der Durchquerung des Cytoplasmas so viele BAA-Moleküle abgefangen worden sein, daß hier nur bei der höchsten Konzentration genügend Modifizierungs-Ereignisse stattfinden, um ein Signal nach der PCR sichtbar zu machen. Dies würde bedeuten, daß die nachgewiesene BUR-Region die bevorzugte Stelle ist, mit der BAA reagiert. Die 3' davon liegenden, sensitiven Stellen werden seltener modifiziert, und die entstehende Fragmentemenge ist nicht ausreichend für eine sichtbare PCR-Amplifikation.

Die bei der LM-PCR-Analyse generierte hohe Anzahl an unspezifischen Fragmenten in den Spuren ohne BAA-Modifizierung entstehen, wenn die Sequenase während der Primer-

Extension-Reaktion abbricht. Dabei können besondere Sequenzmotive für einen Abbruch der Synthese verantwortlich oder aber eine rein zufällige Verteilung der Stoppunkte denkbar sein. In jedem Fall wird eine Reihe zufälliger Fragmente generiert, die zu einem Fragmentmuster in der Kontrollspur des Sequenziergels führen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß mit BAA Einzelsträngigkeit von S/MAR-Elementen *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Im S/MAR800 - einem sehr starken Vertreter dieser Elemente gibt es eine präferentielle Reaktionsstelle, welche die destabilisierteste Region des Bereiches darstellt.

### 3.2.2. Nachweis von Einzelstrangcharakter mittels $\text{KMnO}_4$

In der Literatur gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen, in denen einzelsträngige DNA-Konformation mittels  $\text{KMnO}_4$ -„Probing“ nachgewiesen wird. Einen großen Anteil nehmen dabei Untersuchungen zur Strangtrennung in Promotor- oder Enhancer-Regionen von Genen ein, wobei die nachgewiesenen DNA-Strukturen als entscheidende Faktoren bei der Regulation der betroffenen Gene gesehen werden. So wurde z.B. für das c-myc-Gen im 5'-UTR eine einzelsträngige Proteinbindungsstelle für das regulativ wirkende FBP nachgewiesen (Duncan, 1994, 1996; Michelotti, 1996). Strangtrennung im Promotor nicht induzierter hsp-Gene aus *Drosophila melanogaster* konnte ebenso gezeigt werden (Giardina, 1992) wie Einzelstrangausbildung bei der Transkriptionsinitiation des lac Promotors (Sasse-Dwight, 1989). Holstege et al. konnten 1997 unter Verwendung von  $\text{KMnO}_4$  zeigen, daß während der Transkription von Genen einzelsträngige „transcription bubbles“ auftreten.

Die Bedeutung einzelsträngiger DNA für die Assoziation des Chromatins mit der Kernmatrix wurde 1994 von Kay und Bode durch Bindungsstudien demonstriert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die S/MAR-Kernmatrix-Interaktion zum Teil auf der Erkennung einzelsträngiger DNA basiert, während allerdings eine Teil der Matrix-Bindungsplätze unzugänglich für DNA in Einzelstrang-Konformation ist.

#### 3.2.2.1. Besonderheiten der $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung

Der Nachweis der Einzelsträngigkeit mittels  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung und LM-PCR-Analyse stützte sich auf ein von Hershkovitz und Riggs (1997) veröffentlichtes Protokoll. In den dort beschriebenen Untersuchungen wurde DNA des S/MAR800-Elementes analysiert. Es konnte allerdings keine Strangtrennung von den Autoren nachgewiesen werden. In den *in vitro* und *in vivo*-Experimenten konnte kein Unterschied in den Fragmentmustern der Kontrollspuren zu denen  $\text{KMnO}_4$ -behandelter Proben festgestellt werden.

Die in der hier vorgelegten Doktorarbeit präsentierten Experimente konnten zeigen, daß eine Schwellenkonzentration von ca. 40 mM  $\text{KMnO}_4$  notwendig ist, um Effekte beobachten zu



können. Bei niedrigeren Konzentrationen verändert sich das Fragmentmuster im Vergleich zur Kontrolle nicht. Der Effekt der Modifizierung erscheint nicht allmählich indem einzelne Banden langsam schwächer oder stärker erscheinen, sondern es kommt zwischen 20 und 40 mM  $\text{KMnO}_4$  zu einem plötzlichen Sprung im Fragmentmuster. Möglicherweise ist eine initiale Modifizierung in einem einzelsträngigen Bereich bei einer Mindestanzahl von Zellen notwendig, um eine für eine spezifische PCR-Amplifikation genügende Menge an Fragmenten zu generieren.

Für das Auftreten der Einzelsträngigkeit unter bestimmten Bedingungen konnte eine Abhängigkeit vom herrschenden Ionenmilieu nachgewiesen werden (Kap.2.1.4.1). Insbesondere die Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen hat nach Kowalski et al., sowie Kohwi-Shigematsu et al. einen Einfluß auf die Ausbildung der einzelsträngigen Bereiche. Die Wirkung von zweiwertigen Ionen liegt in der Stabilisierung der Doppelhelix, wobei Einzelsträngigkeit auf schmale Bereiche begrenzt wird. Wie aus Abb.2.8 ersichtlich, konnte bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten nach Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen im Puffer eine Signalstärkeerhöhung der  $\text{KMnO}_4$ -spezifischen Fragmente beobachtet werden. Dies ist nur auf den ersten Blick ein Widerspruch zu den veröffentlichten Daten, denn die beobachtete Signalstärkeerhöhung kann durch Besonderheiten der LM-PCR Methode erklärt werden: In einem Modifizierungsmilieu ohne  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen ist der Einzelstrangcharakter über einen weiteren Bereich verteilt.  $\text{KMnO}_4$ -Zugabe führt bei einer hohen Anzahl unterschiedlicher Nukleotide zur Modifizierung. In der anschließenden LM-PCR werden viele verschiedene Fragmente amplifiziert. Wird  $\text{Mg}^{2+}$  zum Medium hinzugegeben, beschränken sich die einzelsträngigen,  $\text{KMnO}_4$ -sensitiven Bereiche auf kurze Motive. Der Rest der umgebenden Sequenz wird im Doppelstrang-Zustand stabilisiert. Beim PCR-Nachweis der jetzt geringeren Anzahl modifizierter Nukleotide werden die spezifischen Fragmente, die in größerer Menge als zuvor auftreten, überproportional vermehrt und erscheinen daher intensiver als in Proben ohne  $\text{Mg}^{2+}$  im Reaktionspuffer. Während der DNA-Modifizierung von lebenden Zellen spielen die externen Pufferbedingungen keine entscheidende Rolle. Um das in der Zelle herrschende Milieu nachhaltig zu beeinflussen, müßte eine längere Äquilibration der Zellen mit dem Reaktionspuffer erfolgen. In den zwei Minuten, die für die  $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung benötigt werden, kommt es nicht zu einer derartigen Veränderung des Zell-Ionenmilieus. Die *in vivo* nachgewiesene Einzelsträngigkeit sollte daher eine Funktion des endogenen Milieus darstellen.

Nach Untersuchungen von Kowalski (1984) sowie Sheflin und Kowalski (1984) sollte auch die Zugabe von  $\text{Na}^+$ -Ionen zu einer möglichen Veränderung der Einzelstrangverteilung aufgrund der stabilen Ausprägung von Sekundärstrukturen führen. In den durchgeführten Experimenten konnte jedoch kein solcher Effekt festgestellt werden. Dies liegt möglicherweise daran, daß im untersuchten pCI-Plasmid Sekundärstrukturen nicht die entscheidende Rolle bei der Ausprägung der Strangtrennung spielen.

Vor Beginn der Arbeiten an lebenden Zellen wurde die Fähigkeit des Reagens, einzelsträngige

T-Nukleotide in S/MAR-Elementen spezifisch zu modifizieren, *in vitro* kontrolliert. In Abb.2.9 des Ergebnisteils werden diese Experimente verdeutlicht. Wie auch schon bei den Analysen unter S1 Nuklease-Verwendung, konnte bei Plasmiden unter superhelikaler Spannung eine spezifische Reaktion bestimmter Nukleotide mit dem „footprinting“-Reagenz nachgewiesen werden. Auch bei diesen Experimenten kam es an linearisierter DNA bei hohen Konzentrationen des Reagenz zu Reaktionen mit den zu Einzelsträngigkeit tendierenden Sequenzmotiven. Wieder war die dafür erforderliche Menge der Chemikalie wesentlich höher als für die Reaktion an superhelikaler DNA. Ein Vergleich der sensitiven Stellen im S/MAR800-Fragment ergab eine Übereinstimmung der Reaktivität zu den bei S1-Nuklease- und BAA-„footprinting“ gefundenen Stellen. Die Einzelsträngigkeit dieser Regionen wurde somit unter Verwendung von drei unabhängigen Agenzien bestätigt. Die Motive wie die ATATAT-Box oder PolyT-Sequenzen, in denen eine Aufschmelzung des DNA-Stranges stattfindet, stellen typische Motive der AT-reiche Klasse von S/MAR-Elementen dar.

#### **3.2.2.2. $\text{KMnO}_4$ -Modifizierung *in vivo***

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte zum ersten Mal demonstriert werden, daß die DNA einer Gendomäne *in vivo* an destabilisierten Sequenzabschnitten Einzelstrang-Konformation einnimmt. Ein Kontrollexperiment für den kodierenden Bereich des nicht-transkribierten IFN $\alpha$ -Gens zeigte, daß diese sehr stabile Region in doppelsträngiger Konformation vorliegt. Innerhalb des S/MAR-Elementes wurde an drei destabilisierten Peaks Einzelsträngigkeit nachgewiesen (vgl. Zusammenfassung in Abb.3.1). An den Peaks im I-Fragment und im S/MAR800 wurden an beiden DNA-Stränge das Fragmentmuster nach der Modifizierung *in vivo* mit dem *in vitro* an Plasmid-DNA verglichen. Innerhalb des S/MAR800 konnte dabei unter Verwendung von vom Gen weg gerichteten Primern ein Unterschied im Fragmentmuster *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Innerhalb der Gendomäne wurde an weiteren drei prominenten destabilisierten Regionen Einzelstrangcharakter demonstriert.

#### **Einzelstrangcharakter im S/MAR-Element**

Die funktionelle Bedeutung der nachgewiesenen Einzelstrang-Konformation innerhalb der S/MARs liegt möglicherweise in der Regulation von Transkriptionsprozessen. Die beim Vorschreiten der RNA-Polymerase erzeugte positive superhelikale Spannung wird langfristig von Topoisomerasen aufgelöst. Eine zusätzliche spontane Entlastung könnte auf die Einzelstrangbereiche an den Grenzen der funktionellen Domänen zurückgehen. Die hier „gespeicherte“ negative Superhelizität würde die ankommende positive superhelikale Spannung auffangen und eine schnellere Transkription, die weniger abhängig ist von der Geschwindigkeit der Topoisomerase-Aktivität, wäre denkbar. Ein solches Modell wurde von Bode et al. (2000)

diskutiert. Weitere Hinweise lieferte die Analyse des Collagen I Gens, in dessen ausgedehnten kodierten Bereich periodisch destabilisierte Peaks auftreten, die beim Auffangen der topologischen Spannung während der Transkription mitwirken können (Mielke et al., 2000). Diese Funktion destabilisierter Bereiche sollte allerdings durch Veränderungen der Einzelsträngigkeit während der Genexpression sichtbar werden. In keinem Experiment der vorliegenden Arbeit konnte jedoch ein solcher Vorgang nachgewiesen werden. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, müßten die Analysen auf proximal gelegene Bereiche des S/MAR-Elementes ausgedehnt werden. Besonders die Randgebiete der DNA-Kernmatrix-Assoziation müßten hinsichtlich ihrer Eigenschaften während der Transkription analysiert werden. Sinnvoll wären eventuell auch Untersuchungen an genomischen Domänen, die nicht derart ausgedehnt sind wie die hier untersuchte Interferon- $\alpha$ -Domäne.

Bei der Auswertung der Analysen zur Einzelsträngigkeit *in vivo* ist zu beachten, daß die beiden DNA-Stränge unabhängig voneinander betrachtet werden müssen. Anders als *in vitro*, wo der Einzelstrangnachweis an einem Strang der DNA automatisch auch auf den anderen übertragbar ist, muß in lebenden Zellen die mögliche Assoziation mit Einzelstrang-bindenden Proteinen in Betracht gezogen werden. Im S/MAR-Element wurden daher an zwei Beispiel-Regionen parallel beide DNA-Stränge untersucht. Sowohl im S/MAR800 (Position 2400) als auch im I-Fragment (Position 400) war die Reaktion mit  $\text{KMnO}_4$  auf dem im weiteren Verlauf codierenden DNA-Strang schwach. Obgleich wenige Modifizierungsstellen nachgewiesen wurden, ergab sich kein derart ausgeprägtes Fragmentmuster wie am ursprünglich untersuchten DNA-Strang. Diese Beobachtung ist für das S/MAR800 besonders beachtenswert, da hier bei der Untersuchung von Plasmid-DNA *in vitro* eine höhere Anzahl von Signalen nachweisbar war. Diese Beobachtungen betreffen den Strang, der bei den Untersuchungen von Bode et al. 1992 im Mittelpunkt der Chromatinanalysen stand. Dabei wurden innerhalb der „core-unwinding“-Region der BUR mittels CAA einzelsträngige Nukleotide nachgewiesen. Bei den neuen Experimenten an diesem Strang unter  $\text{KMnO}_4$ -Verwendung konnten die einzigen reaktiven Nukleotide der gesamten destabilisierten Region ebenfalls innerhalb dieses BUR-Bereiches lokalisiert werden. Die Ergebnisse könnten auf Proteinbindung im Bereich des S/MAR800 hindeuten, welche einen Schutz der Nukleotide vor Modifizierungsereignissen nach sich ziehen würde. Der weniger sensitive DNA-Strang könnte dabei die Protein-bindende Sequenz beinhalten. Der Nachweis einer höheren Anzahl von Modifizierungsstellen an der Protein-freien Plasmid-DNA unterstreicht diese Vermutung. Die Base-Unpairing-Region stellt einen zentralen Protein-freien Abschnitt mit ausgeprägter Einzelstrang-Konformation dar.

Auch im I-Fragment konnte eine geringere  $\text{KMnO}_4$ -Sensitivität auf dem Gegenstrang beobachtet werden. In diesem Bereich kann die Diskrepanz möglicherweise durch den hohen Unterschied im T-Gehalt der beiden DNA-Stränge erklärt werden. Im nicht-kodierenden Strang,

in dem eine sehr hohe Anzahl von Modifizierungsstellen nachgewiesen wurden, liegt in den untersuchten 600 bp ein T-Gehalt von 45% vor. Besonders auffällig ist ein dT<sub>(23)</sub> Abschnitt. Der Gegenstrang besteht dagegen nur zu 26,7% aus T-Nukleotiden.

Bisher liegen nur wenige Kenntnisse darüber vor, wie die DNA-Kernmatrix-Assoziation genau aussieht. Für die spezifischen S/MAR-bindenden Proteine BRIGHT und SATB1 wurde eine Erkennung von ATC-Regionen beschrieben (Herrscher, 1995; Nakagomi, 1994). Die sehr häufig auftretenden Protein-Komponenten der Kernmatrix, Topoisomerase II, HMGI(Y), MeCP2/ARBP und Lamin A und B binden in der „Minor Groove“ doppelsträngiger S/MAR-Bereiche. Protein-Interaktionen sind auch für die Einzelstrang-ausbildenden S/MAR-Sequenzen nachgewiesen. Daran sind solche Proteine wie SAF-A, Nucleolin und PARP beteiligt, aber auch spezifische Assoziationen der Lamine mit einzelsträngigen Bereichen sind gezeigt worden (zusammenfassend dargestellt in Bode et al. 2000; Ludérus et al., 1994). Für HMGI(Y) und HMG 1/2 wurde außerdem eine Erkennung von besonderen Sekundärstrukturen, wie „curved“-DNA oder „cruciforms“ gezeigt. Weiterführende Informationen zur Proteinbindung können „footprinting“-Analysen mit Einzelnukleotid-Auflösung nach „crosslinking“ von DNA und Proteinen liefern. Geeignete „footprinting“-Reagenzien für solche Untersuchungen sind z.B. Formaldehyd (Göhring, 1997; deBelle 1998), welches beim Nachweis der *in vivo*-Bindung von SAF-A angewendet wurde oder Cis-Platin (Samual, 1998), das bei der Analyse der DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren in Brustkrebs-Zellen eingesetzt wurde. Die Versuchsprozedur würde eine Isolierung der mit den Proteinen durch das „crosslinking“-Reagenz kovalent verbundenen DNA, die Lösung der DNA-Protein-Bindung unter Markierung der DNA-Bindungsstelle und die Lokalisierung der markierten Nukleotide beinhalten.

### **Nachweis von Einzelsträngigkeit *in vivo* an destabilisierten Bereichen innerhalb der Gendomäne**

Das SIDD-Profil der IFN $\alpha$ -Domäne weist sowohl 5' als auch 3' vom Gen in Abschnitten ohne S/MAR-Bindungsaktivität kurze destabilisierte Regionen auf. Die Analyse der drei 5' liegenden Peaks mit KMnO<sub>4</sub> und LM-PCR zeigte, daß an diesen Sequenzen kurze Einzelstrangabschnitte auftreten. Der Peak an Position 7000 ist besonders kennzeichnend. Bei den *in vivo* Analysen zeigten sich wenige KMnO<sub>4</sub>-sensitive Nukleotide am Rand der destabilisierten Region. Genau im Zentrum dagegen konnten intensive Signale beobachtet werden, die auf ausgeprägte Strangtrennung hinweisen. Dieses Ergebnis gewinnt voll allem dadurch Bedeutung, daß in der Sequenz der destabilisierten Region ein ATC-Motiv lokalisiert ist, welches als Bindungsmotiv für das Protein SATB1 identifiziert wurde (Nakagomi, 1994). Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der schwachen S1 Nuklease-Sensitivität von ATC-Regionen. Offensichtlich ist eine generalisierte Aussage zur Struktur der ATC-Bereiche nicht vornehmbar. Ob tatsächlich Protein-

bindung vorliegt, möglicherweise auf dem nicht-untersuchten Gegenstrang, muß noch geklärt werden. Denkbar wäre z.B., daß es sich bei diesem Abschnitt um einen lokalen, fakultativ benutzten Anheftungspunkt an die Kernmatrix handelt. Bisher wurden die Bindungseigenschaften der destabilisierten Abschnitte als solche nicht einzeln untersucht. Einzig das gesamte C-Fragment von 4,4 kbp sowie die Subfragmente C5' und C3' wurden in Scaffold-Bindungsassay analysiert und zeigten nur schwache Aktivität. Da die Untersuchungen von Mielke et al. (2000) am Kollagen1-Gen demonstrierten, daß an kurzen destabilisierten Sequenzen von nur 300 bp Länge S/MAR-Bindungsaktivität nachweisbar ist, wäre eine detaillierte Bindungsstudie kürzerer Abschnitte der IFN $\alpha$ -Domäne von Interesse.

Ein Einfluß der Induktion der Genexpression auf die gemessene KMnO<sub>4</sub>-Sensitivität konnte hier genauso wie innerhalb der S/MAR-Bereiche nicht nachgewiesen werden. Die Induktion des  $\alpha$ -Interferon-Gens erfolgt nach Infektion mit Viren innerhalb sehr kurzer Zeit. Bereits nach drei Stunden ist eine hohe Menge an spezifischer mRNA nachweisbar, die auf aktive Transkription schließen läßt. Nach 24 Stunden beginnt bereits wieder die Abschaltung des Gens (Bode et al., 1986). An der schnellen Genaktivierung sind der Promotor- und Enhancer-Bereich des Gens wesentlich beteiligt (Thanos und Maniatis, 1995). Ein Umbau der gesamten Domänenstruktur während der kurzen Aktivierungsphase ist nicht wahrscheinlich. Denkbar ist eher, daß sich das Gen gewissermaßen in „Wartestellung“ befindet - nicht aktiv aber bereit für sofortige Aktivierung, um bei Virusinfektion so schnell wie möglich angeschaltet zu werden. Veränderungen der Domänenstruktur während der Aktivierung von Genen sind bei Entwicklung-spezifischen Genaktivierungen wahrscheinlicher. Zum Beispiel ist bekannt, daß sich die Sensitivität ganzer Domänen gegenüber Nukleasen, insbesondere DNaseI, als Ausdruck der Architektur der Chromatinstruktur bei der entwicklungs- oder differenzierungsbedingten Aktivierung bestimmter Gene ändern kann. Intensive Untersuchungen hierzu wurden am  $\alpha$ -Globin-Gencluster vorgenommen (Forrester et al., 1986). Weitere Hinweise auf regulatorisch wirksame Bereiche sollte die Analyse der DNase I-Sensitivität und die Identifizierung hypersensitiver Stellen liefern.

### **3.3. Nuklease-Sensitivität der IFN $\alpha$ -Domäne - Identifizierung DNase I hypersensitiver Stellen (DNase-HS)**

Die Analyse der DNase-I-Sensitivität eines Bereiches und die Identifizierung hypersensitiver Stellen kann Auskunft über die Position regulatorisch wirksamer Sequenzen geben. Die Bedeutung der DNaseI-hypersensitiven Stellen (DNase-HS) für die Genexpression wurde besonders intensiv am menschlichen  $\alpha$ -Globin-Gencluster untersucht. In dieser Region wurde 5' von den Genen eine Ansammlung von fünf DNase-HS identifiziert, die in ihrer Gesamtheit die Transkription der Gene des Clusters wesentlich regulieren und daher als „Locus Control Region „ (LCR) bezeichnet werden (Driscoll, 1989; Forrester, 1986 & 1990; Kioussis, 1983). Die DNase-

HS2 des LCR besitzt Enhancer-Funktion (Fraser, 1993; Grosveld, 1987; Wijgerde, 1995), jede einzelne DNase-HS wirkt aber als Isolator gegen den Einfluß des umgebenden Chromatins (Chung, 1993). In späteren Veröffentlichungen wurde die besondere Struktur der DNase-HS analysiert. Lowrey (1992) and Stamatoyannopoulos (1995) zeigten, daß Proteinbindungsstellen für GATA-1, NF-E2 und SP-1 für die Ausbildung der DNase-HS4 essentiell sind. Die DNaseI-Hypersensitivität selbst entsteht durch eine spezifische Positionierung der Nukleosomen auf der Sequenz und die besondere Tertiärstruktur der DNA. Bereits 1984 wurde gezeigt, daß torsionale Spannung zur Ausprägung DNase-sensitiver Stellen führen kann (Villeponteau, 1984). In vielen anderen Loci ist die regulatorische Wirkung solcher Elemente auf die Genexpression wahrscheinlich. Dies gilt z.B. für IL-5 (Valentine, 1998), das c-myc-Gen (Murphy, 1996) oder den Lysozym-Locus im Hühnchen (Krüger, 1999).

Die sich stets erweiternde Liste von Genen, die durch Regionen mit erhöhter DNase I-Sensitivität reguliert werden, war Anlaß, in der IFN $\alpha$ -Domäne nach DNase-HS zu suchen und die Möglichkeit, ob solche Bereiche mit dem SIDD-Profil vorhersagbar sind, zu prüfen. Ein umfassende DNaseI-Analyse wurde in der im Rahmen dieses Projektes konzipierten und betreuten Diplomarbeit von E.Ernst vorgelegt. In dieser Arbeit konnten an verschiedenen Stellen der IFN $\alpha$ -Domäne DNase-HS nachgewiesen werden. Ein Vergleich zum SIDD-Profil zeigte eine gute Korrelation mit destabilisierten Peaks. Durch diese Ergebnisse wurden die Hinweise der KMnO<sub>4</sub>-Analysen, daß begrenzte Destabilisierung außerhalb der S/MAR-Elemente ein Indiz für besonders offene Chromatinstruktur darstellt, bestätigt.

Einen interessanten Aspekt stellt der Nachweis von DNase I-Sensitivität im PolyA-Bereich des Gens dar. Die Bedeutung der DNase-HS für die Regulation des IFN $\alpha$ -Gens konnte noch nicht geklärt werden. Die „footprinting“-Untersuchungen mittels LM-PCR zeigten keine Veränderungen der Struktur in Abhängigkeit von den Genexpression. Eine Konsequenz der besonderen DNA-Struktur dieser Stellen ist eine mögliche chromosomale Instabilität, die zu Deletionsereignissen führen kann. Die Kolokalisierung der DNase-HS mit einem an Position 8500 lokalisierten Deletionsbruchpunkt einer Gliomazelllinie (Pomykala, 1994) ist ein weiterer Hinweis, der diese Überlegung stützt.

Innerhalb des 5'S/MARs läßt sich keine besondere Sensitivität für DNase I feststellen. Allerdings konnten einige Schnittstellen endogener Nukleasen im S/MAR-Bereich lokalisiert werden. Diese endogenen DNA-abbauenden Enzyme werden bei Stresseinwirkung auf die Zellen sehr leicht aktiviert, wie durch die Permeabilisierung aber auch durch FCS-Entzug gezeigt werden konnte. Möglicherweise werden durch die Permeabilisierung intrazelluläre Kompartiment-Grenzen zerstört. Nukleasen, die vorher nicht vor Ort waren, könnten dadurch aktiviert werden. Die Schnittstellen endogener Nukleasen könnte auch durch schnelle Aktivierung direkt assoziierter, nukleolytischer Enzyme hervorgerufen werden. Die Spaltung der

DNA würde schneller als durch exogen zugeführte DNase I sichtbar werden und könnte die experimentellen Daten erklären.

Die Abfolge der Fragmente im Sequenziergel DNase-behandelter Proben nach der LM-PCR soll Aufschluß über die Zugänglichkeit der DNA *in vivo* geben. An Bereichen, die mit Proteinen assoziiert sind, ist die DNA nicht zugänglich für abbauende Enzyme. Es entstehen daher „Fenster“ in der Sequenzleiter. An einigen Stellen, wie nahe des Transkriptionsstarts des IFN-Gen aber auch im I-Fragment des S/MARs ergab solch ein typischer auf Proteinbindung hindeutender „footprint“. An anderen Positionen, wie an der DNase-HS im destabilisierten Bereich um Position 7000, ist das Fragmentmuster weniger eindeutig (Abb.2.12). Hier zeigte sich, daß die Signalstärken der Fragmente im stabilen Bereich vor der DNase-HS schwächer sind als innerhalb des Peaks. Genau im Zentrum der DNase-HS dagegen sind die Fragmente sehr deutlich und liegen dicht beieinander, was ein Hinweis auf freie DNA in diesem Bereich ist. Eine Interpretation der LM-PCR-Analysen ist häufig insofern erschwert, als die Veränderungen des Fragmentmusters mit steigenden DNase I-Konzentrationen nicht deutlich werden. Insgesamt verlangen die Daten dieser Experimente nach weiterführenden Analysen, um den bisherigen Hinweisen auf Proteinbindung nachzugehen.

Eine Veränderung des DNase I-Schnittmusters nach Induktion der Genexpression wurde von Bode et al. (1986) beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die DNase-Sensitivität in Abhängigkeit von der Genaktivität in LM-PCR-Experimenten an einer Auswahl von Regionen analysiert. Dabei konnten weder innerhalb des S/MAR-Elementes noch an den hypersensitiven Bereichen der Gendomäne Veränderungen der DNase I-Sensitivität beobachtet werden. Weitere Southern-Analysen ausgedehnter Bereiche könnten diese Ergebnisse bestätigen.

### **3.4. Identifizierung der Erkennungsstellen von Topoisomerase II innerhalb der IFN- $\alpha$ -Domäne**

Biologische Prozesse an der DNA laufen nur unter definierten topologischen Bedingungen ab. Während dieser Prozesse kommt es häufig zu Veränderungen der Superhelizität, die später wieder ausgeglichen werden müssen. Topoisomerasen sind Enzyme, die die Konformation der DNA durch Veränderung der superhelikalen Spannung beeinflussen. Sie gehören zu den essentiellen Komponenten des Zellkern. Dunaway und Ostrander (1993) konnten zeigen, daß die DNA-Topologie bei der Aktivierung eukaryontischer Promotoren eine Rolle spielt. Topoisomerase-Aktivität während der Replikation oder Transkription sind dagegen schon lange bekannt. Die Stellen, an denen Topoisomerasen *in vivo* aktiv sind, stimmen nach den Beobachtungen von Käs et al. (1992) nicht zwingend mit den lokalisierten Konsensussequenzen überein. Die Bereiche, an denen die Enzymbindung erfolgt, scheinen vielmehr durch die Struktur des Chromatins determiniert zu sein.

Die in der vorliegenden Arbeit innerhalb der Gendomäne lokalisierten Topoisomerase II-Schnittstellen stimmen sämtlich mit den Positionen von DNase I-Schnittstellen oder denen endogener Nukleasen überein. Diese Daten werden durch Beobachtungen an anderen Loci unterstützt. Reitmann et al. zeigten 1990 die Kollokalisierung von DNase-HS und Topoisomerase II-Schnittstellen an  $\alpha$ -Globin-Locus im Huhn. Bereits 1988 führten Müller et al. Experimente durch, welche bewiesen, daß die DNaseI-Hypersensitivität auch dann erhalten bleibt, wenn die Topoisomerase-Aktivität inhibiert wurde. Daraus wurde geschlossen, daß die beobachtete offene DNA-Struktur keine Folge der Topoisomerase-Aktivität sondern Voraussetzung für die Bindung der Enzyme ist. Die Ausprägung der Chromatinstruktur an Topoisomerase-Erkennungsstellen geht nach den Ergebnissen der  $\text{KMnO}_4$ -Analysen auf Instabilität der DNA-Doppelbindung zurück. Sie entsteht als Konsequenz der besonders AT-reichen Sequenz, wobei spezifische Sequenzmotive zur Ausprägung der Strangtrennung beitragen. Durch die Destabilisierung der B-DNA-Konformation kann vermutlich eine Verpackung zu höheren Kondensationsstufen nicht stattfinden. Solche konstitutiv offenen Regionen könnten dominante Sequenzsignale darstellen, die von regulatorischer Bedeutung sind.

Ein weiterer Effekt der besonderen Chromatinstruktur an Topoisomerase II-Schnittstellen ist die höhere Tendenz zur Entstehung von Strangbrüchen. Strissel et al. (1998) konnten einige Bruchpunkte von Deletionseignissen in der MLL-Cluster Region, die häufig bei Leukämiepatienten gefunden werden, an Stellen nachweisen, die sowohl DNase I-Hypersensitivität als auch Topoisomerase II-Aktivität aufweisen. Häufig wird auch eine Lokalisierung von Topoisomerase II-Schnittstellen innerhalb von S/MAR-Elementen beschrieben. In diesem Zusammenhang stehen Veröffentlichungen von Sperry et al. (1989) nach denen diese Elemente „Hotspots“ für illegitime Rekombinationsereignisse darstellen. Die Daten der vorliegenden Arbeit decken sich eher mit Untersuchungen, nach denen die Topoisomerase-Sites am Rand der S/MARs liegen. Im 5'S/MAR der IFN $\alpha$ -Domäne konnten nur an zwei Stellen Schnittstellen dieser Enzyme lokalisiert werden. Die meisten befanden sich am Rand des S/MARs. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden von Hensel et al. (2000), die feststellten, daß viele mit Topoisomerase-Schnittstellen korrelierende Bruchpunkte im MLL-Gen zwischen zwei S/MAR-Elementen liegen.

### **3.5. Das Sequenzierprojekt zur Entschlüsselung der genetischen Information auf dem humanen Chromosom 9 p21-22**

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms ist eines der größten wissenschaftlichen Projekte in der Geschichte der Biologie. Weltweit sind Arbeitsgruppen mit der Vorbereitung, Koordination, Durchführung und Auswertung der Sequenzierarbeiten beschäftigt. Die Koordination der Arbeit an den einzelnen Chromosomen obliegt den großen Sequenzierzentren. Hier werden die Informationen und das Material für die anschließende, möglichst effektive Sequenzierung



gesammelt und die Aufträge für die Bearbeitung einzelner Bereiche verteilt. Die anfallende große Menge an Sequenzen erfordert eine sinnvolle Speicherung und Katalogisierung mit dem Ziel, über das Internet einen freien Zugang zu diesen Informationen zu ermöglichen.

### **Mithilfe bei der Vorbereitung der Sequenzierung des humanen IFN-Genclusters**

Nach Beginn der Sequenzierungen an der GBF wurde die Koordination der Arbeiten an Chromosom 9 dem Sanger-Zentrum übertragen. Im Vorfeld wurden Klone gesammelt, die als Ausgangsmaterial für diese Sequenzierung geeignet waren. Dazu konnte mit den, innerhalb der vorgestellten Arbeit, analysierten Klonen ein wichtiger Teil beigetragen werden. Ausgangspunkt waren Cosmid-Klone einer Chromosom 9-spezifischen Cosmid-Bank. Nach PCR- und „Fingerprintstudien“ wurden ausgewählte Klone für die Identifizierung von PAC- und BAC-Klonen mit genomischen Inserts aus den Interferon-Gencluster verwendet. Die resultierenden Klone dienten der Erstellung einer physikalischen Karte der Region. In die endgültige physikalische Karte der Region p21-22 des Sanger-Zentrums gingen die hier vorgestellten Klone und Fingerprint-Daten ein und dienten der Vervollständigung des Gesamtbildes. Einige der Klone (z.B. bA1P8) sind für die Sequenzierungsarbeiten ausgewählt worden. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit geleistete Arbeit konnte somit zum Vorankommen der Entschlüsselung dieser genomischen Region wesentlich beitragen.

Die derzeit bereits veröffentlichten Daten werden mit Hilfe verschiedener Vorhersagemodelle auf das Vorhandensein struktureller Elemente geprüft. In einer weiterführenden Promotionsarbeit von Fr. Sandra Götze werden diese Daten zur Erstellung eines Gesamtbildes der Struktur des Interferon-Genclusters verwendet. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung der Domänenstruktur der Region unter Beteiligung vorhandener S/MAR-Elemente. Die Anwendung der Vorhersageprogramme wird erweitert und das Resultat durch biochemische Scaffold-Bindungsexperimente überprüft und gegebenenfalls verbessert.

### **3.6. Ausblick**

Die vorgelegte Arbeit ist Teil des Projektes zur Sequenzierung des humanen Chromosoms 9. Für die Durchführung des Genomprojektes stehen eine Reihe genomischer Banken als Materialquelle zur Verfügung. Die DNA der Spender wurde hierfür in BAC- oder PAC-Vektoren kloniert (Pierce et al., 1992; Ioannou et al., 1994; Frengen et al., 1999). Die Vorgehensweise des internationalen Konsortiums, welches an der Sequenzierung arbeitet, beinhaltet die Identifizierung von solchen Klonen, die genomische Bereiche aus den Zielregionen mit möglichst geringer Überlappung tragen. Ist die Auswahl getroffen, kann mit der Sequenzierung begonnen werden. Aus den ersten Daten wird eine Entwurfssequenz bestehend aus noch sehr vielen, größeren Teilen, sogenannten Contigs, erstellt. Die meiste Zeit nimmt die Schließung der vorhandenen

Lücken und die Ordnung bzw. der Zusammenbau der Contigs ein.

Mit wachsender Menge an genetischen Informationen rücken neue Aufgaben in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Arbeit. Besondere Bedeutung bei der Auswertung der Sequenzen kommt der Entwicklung neuer Verfahren zur Vorhersage genomischer Funktionen zu. Die Mängel bisheriger Methoden liegen dabei ganz klar in der hohen Fehlerrate. Eine Kombination von Vorhersage codierender und regulatorisch struktureller Bereiche wird zu einer wesentlichen Effektivitätssteigerung bei der Identifizierung funktioneller Sequenzabschnitte führen.

S/MARs sind die DNA-Elemente, denen eine Hauptaufgabe bei der Organisation genomischer Domänen zukommt. Die Berechnung ihrer Position wird nicht nur der Bestimmung der Grenzen von Transkriptionseinheiten dienen, sondern wird gleichzeitig wichtige Hinweise auf funktionelle Aspekte der Genexpression liefern. Beispiele für die Bedeutung der S/MARs als Marker für Genfunktionalität sind die Befunde, daß Pseudogene über keine funktionellen, in ihrer Sequenz destabilisierten S/MAR-Elemente mehr verfügen. Auch die Funktion von Polyadenylierungsstellen und Replikationsstartpunkten ist eng mit der Destabilisierung der DNA in diesen Bereichen verbunden.

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß das SIDD-Profil, mit der ihm zugrunde liegenden Berechnung der Stabilität der DNA-Doppelhelix, in der Lage ist, funktionelle S/MAR-Elemente vorherzusagen. Diese Ergebnisse konnten anhand der breiten Chromatinstrukturstudien der vorliegenden Arbeit bestätigt und erweitert werden. Die Vorhersagen der Destabilisierung der DNA können darüber hinaus für die Identifizierung offenen Chromatinbereiche, die durch DNase I-Hypersensitivität und Topoisomerase II-Aktivität gekennzeichnet sind, Anwendung finden. Das SIDD-Profil birgt unter Ausschöpfung seiner Möglichkeiten ein enormes Potential zum Voranbringen der „Genomics“-Forschung der kommenden Jahre.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Geräte

#### Tischzentrifugen

Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco

Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico

#### Kühlzentrifugen

Rotoren

Sorvall RC 5

SS34 und GSA

Jouan CR412

#### Ultrazentrifuge

Rotoren

Sorvall Combi OTDC

Beckmann TI50, TI10, TI70

#### Fluorometer

Hoefer TKO 100

#### Scintillationszähler

Beckmann LS 1701

#### Gelelektrophoresekammer

BRL Horizon 1114

Gibco BRL Horizon 58

Gibco BRL S2 Sequencing Gel Electrophoresis Systems

Pharmacia Babygelkammer

#### Mikroskop

Olympus CK 2

Leitz Labovert

#### UV-Kammer

Hanau

#### Videograph

Biotec Fischer Video Densitometer

Mitsubishi Thermodrucker und Personal Computer

#### Transluminator

Appligene

#### Netzgeräte

Pharmacia Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150

Biorad Power Pac 200

Biorad Power Pac 300

#### Zellkultur-Inkubatoren

Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336

**Cleanbenches**

Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400

Heraeus, HLB 2448

Heraeus, HSP 18

**PCR-Maschine**

Perkin Elmer Cetus DNA-Thermal Cyclor 480

**pH-Meter**

Ö 50, Beckmann

**Thermomixer**

Eppendorf Thermomixer 5436

**Vortex**

Scientific Industries Vortex Genie 2

**Hybridisierungsöfen**

Robbins Scientific Hybridization Incubator Model 310

Stuart Scientific Hybridization Incubator

**Elektroblot**

OWL-Scientific

**Crosslinker**

Stratagene Stratalinker

**Laborschüttler**

Heidolph

**4.2. Material****Filterpapiere und Transferfolien****Sterilfiltration**

Sartorius Membranfilter, Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm, d = 47 mm

**Nylonmembran**

Zeta-Probe, Fa. BioRad

Biodyne B Transfer Membrane, Fa. Pall

Nylon Membranes, positivly charged, Fa. Roche

**DEAE-Papier**

Whatman 3MM

## **Autoradiographie**

### **Röntgenfilme**

AGFA-Gevaert Curix RP1

### **Expositionskammer**

AGFA-Gevaert, mit Verstärkerfolie Curix MR 600 SE 6

Molecular Dynamics Expositionskassetten für den Phosphoimager

## **Chemikalien**

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Merck, Pharmacia, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, Stratagene und USB verwendet. Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler sowie Roche Pharma bezogen.

Die Enzyme lieferten Amersham-Buchler, BRL, Biolabs, Roche Pharma, Pharmacia und USB.

## **Zellkulturmaterialien**

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

## **Computerprogramme**

Die Texte und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Programmpaketes *Corel Word Perfect Suite 8*, sowie des Programms *Adobe Photoshop 5.0* erstellt. *VCH Biblio 3.2* diente der Literaturverwaltung. Zur Literaturrecherche diente *Medline* und *Current Contents*.

Die Auswertung von Autoradiographien erfolgte mit *Image Quant Version 5.0* von Molecular Dynamics. Zur Auswertung der Fingerprint-Gele wurde mit *Bio-Rad Multi-Analyst<sup>TM</sup>/PC-Version 1.1* vorgenommen. Zur Durchführung von Sequenzanalysen und Restriktionskartierungen wurden *Vector NTI 4.0 und 5.0* von ATCC sowie das Programm *gcg* der Genetics Compu-tergroup verwendet.

## **4.3. Allgemeine Grundtechniken**

(nach Sambrook et al., 1989)

### **4.3.1. Sterilisieren**

Glasgeräte werden vor Gebrauch 4 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

Alle Lösungen werden sterilfiltriert (0,22 µm Filter) oder autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar).

### 4.3.2. Phenolisierung von Nukleinsäuren

Phenol (Fa. Roth): redestilliertes, in TE äquilibriertes Phenol, pH 7,5-8,0, Zusatz von 0,1% (w/v) 8-Hydroxychinolin

TE : 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, pH 8,0

Die wäßrige Nukleinsäurelösung wird im Eppendorfgefäß mit 0,75 v/v an Phenol versetzt und auf dem Vortex-Mixer gemischt. Zur Phasentrennung ist eine kurze Zentrifugation notwendig. Durch Zugabe von 0,25 v/v Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) werden Phenolreste entfernt. Das durch Zugabe von 1 v/v an abs. Ethanol erhaltene Präzipitat wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE aufgenommen.

### 4.3.3. Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung versetzt man 1 Volumen wäßriger DNA-Lösung mit 1 Volumen 75 mM NaOAc in Ethanol, fällt für 2h bei RT und zentrifugiert anschließend 5 Minuten mit 1800 UpM bei 4°C. Das Pellet wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, 10 min über Kopf getrocknet und in TE gelöst.

### 4.3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren - Fluorometrische Bestimmung

Hoechstfarbstoff H33258

Kalbsthymus-DNA Standard : 100 µg/ml

10x TNE-Puffer : 100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,4

Färbelösung : 0,1 µg/ml Hoechstfarbstoff in 1x TNE-Puffer

Die Konzentration wird mit Hilfe eines Fluorometers ermittelt. Dazu werden 2 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung in 2 ml Färbelösung (vorgelegt in der Küvette) bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$  angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$  gemessen. Die Eichung des Gerätes erfolgt durch 2 µl des DNA-Standards in 2 ml der Färbelösung.

Geringe Nukleinsäuremengen lassen sich auch durch Elektrophorese eines Aliquots abschätzen. Die Fluoreszenzintensität der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ist ihrer Menge direkt proportional. Daher kann durch visuellen Vergleich der unbekannten Probe mit einer DNA bekannter Konzentration die unbekannte Menge abgeschätzt werden.

## 4.4. Arbeiten mit E.coli

### 4.4.1. E.coli-Stämme

DH1: F<sup>-</sup>, endA1, gyrA96, hsdR17(r<sup>-</sup>, m<sup>+</sup>), recA1, supE44, thi-1 (Hanahan, 1983)

DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup>, endA1, gyrA96, hsdR17(r<sup>-</sup>, m<sup>+</sup>), recA1, supE44, thi-1,  $\Delta$ (argF-lacZYA)U169,  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 (Hanahan, 1983)

Sure: e14<sup>-</sup>(mcrA),  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, RecB, recJ, sbcC, umuC:Tn5 (kan<sup>r</sup>), uvrC, [F'proAB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10, (tet<sup>r</sup>)], (Greener, 1990)

XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10, (tet<sup>r</sup>)], (Bullock, 1987)

#### 4.4.2. Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypon, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, autoklavieren.

TB-Medium: 12 g Bacto-Trypon, 24 g Bacto-Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, ad 900 ml, autoklavieren; vor Gebrauch werden 100 ml steriles 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zugesetzt.

#### 4.4.3. Herstellung von Agarplatten

Dem LB-Medium werden 15 g Agar pro Liter zugegeben. Zur Herstellung Ampicillin-haltiger Agarplatten wird 1/1000 Volumen Ampicillin einer sterilfiltrierten Stammlösung (50 mg/ml in Ethanol) beigemischt.

#### 4.4.4. Herstellung kompetenter Bakterien

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Man läßt die Zellen bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 wachsen und zentrifugiert sie anschließend 10 min in einem vorgekühlten GS3-Rotor bei 3000 UpM ab. Das Zellpellet wird nun in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und wie beim ersten Mal zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen und wiederum wie oben zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 20 ml kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert, wie oben beschrieben zentrifugiert und schließlich in einem Endvolumen von 2-3 ml 10%igem Glycerin resuspendiert. Die so aufgenommenen Zellen werden in 50  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### 4.4.5. Elektrotransformation von *E.coli*

Bei der Elektrotransformation wird ein Gemisch aus DNA und kompetenten Zellen einem exponentiell abfallenden elektrischen Feld mit einer sehr hohen Ausgangsamplitude ausgesetzt. Die Transformationseffizienz liegt je nach Qualität der elektrokompenten Bakterien bei 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> Transformanten/ $\mu$ g DNA.

Ein 50 µl Aliquot der kompetenten Zellen wird bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gestellt. 1 µl einer Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes wird hinzugegeben, gut gemischt, und der Ansatz wird in eine sterile, vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend wird die Küvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt. Pulse Controller und Gene Pulser werden auf 2,5 kV, 25 µF und 200 µs eingestellt. Die Zeitkonstante, die am Gerät überprüft werden kann, sollte zwischen 4-5 ms betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann 112,5 kV/cm. Danach werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenbergröhrchen überführt und bei 37°C 20-30 min geschüttelt. Anschließend werden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert. Man läßt die Klone über Nacht bei 37°C heranwachsen und kann sie dann durch eine „Mini“- Plasmidpräparation charakterisieren.

#### 4.4.6. Konservieren von Bakterienkolonien

Zur kurzfristigen Lagerung werden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht inkubiert und im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt.

Eine langfristige Lagerung ist durch Vermischen einer 5 ml Übernachtskultur mit 87% Glycerin im Verhältnis 1:1 und Aufbewahren bei -20°C oder -70°C möglich.

### 4.5. Isolierung von Nukleinsäuren

#### 4.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab

##### „Boiling Prep“(nach Dan Cimbora, FHCR Seattle)

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle E.coli Laborstämme (DH5á, DH10B, XL1Blue, außer für CMK 603 (recA+). Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (etwa 30 min) und in der hohen Qualität der DNA (basiert auf „Boiling Prep“ nach Holmes and Quigley).

STET:	für 500 ml
8% Sucrose	40g
0,5% Triton	12,5 ml Triton 20%
50 mM EDTA	50 ml 0,5 M EDTA
10 mM Tris (pH8)	5 ml 1 M Tris/HCl
LTE:	10 mg Lysozym / 1 ml TE
7,5 M NH <sub>4</sub> Ac	
TER:	10 µg RNase A / 1 ml TE
Autoklavierte Zahnstocher	



Eine *E.coli* 2 ml LB/TB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wird für 4-16 h bei 37°C geschüttelt. Nach dem Umfüllen in 2,2 ml Eppendorfgefäße werden die Proben für 1 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Die Pellets werden in je 500 µl STET-Puffer suspendiert und mit 50 µl LTE (10 mg/ml, bei -20°C lagern) versetzt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT werden die Proben 90 s in einem Eppendorf-Thermomixer bei 95°C inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation (14000 UpM) bildet sich ein zähflüssiges Pellet, das mit einem Zahnstocher entfernt wird. Es werden 50 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac und 500 µl Isopropanol zugefügt, gevortext und die DNA für 5 min bei 14000 UpM pelletiert. Nach kurzem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TER-Lösung (RNase A 10µg/ml) aufgenommen. Es werden 5 µl zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

#### 4.5.2. Präparative Plasmidisolierung

##### „Maxi“ Plasmidpräparation (Qiagen)

Puffer P1 (Resuspensionspuffer) : 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer P2 (Lysispuffer) : 200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3 (Renaturierungspuffer) : 3,0 M NH<sub>4</sub>OAc

Puffer QBT (Equilibrierungspuffer) : 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol  
0,15% Triton X-100

Puffer QC (Waschpuffer) : 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol

Puffer QF (Elutionspuffer) : 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 15% Ethanol  
QX-500 Säulen

Die zu präparierenden Bakterienklone werden in 500 ml LB-Medium in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten, 5000 UpM) werden die Kulturen nach den Angaben des Herstellers Qiagen aufgearbeitet. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt bei dieser Methode durch die Bindung der DNA an eine Anionenaustauscher-Säule basierend auf SiO<sub>2</sub>. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschrte wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und mit 70% Ethanol entsalzt.

#### 4.5.3. Präparation von Cosmid- und PAC-DNA (optimiert nach Conrad und Schön)

2 YT-Medium

Kanamycin (50mg/ml)

Puffer P1 (Resuspensionspuffer) : 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer P2 (Lysispuffer) : 200 mM NaOH, 1% SDS

---

Puffer P3 (Renaturierungspuffer) :	3,0 M NH <sub>4</sub> OAc
Puffer QBT (Equilibrierungspuffer) :	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol 0,15% Triton X-100
Puffer QC (Waschpuffer) :	1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol
Puffer QF (Elutionspuffer) :	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 15% Ethanol
QX-100 Säulen	

100 ml LB-Medium wird mit 15 µl einer Glycerinkultur und dem entsprechenden beimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Nachdem bei 4°C und 6000 UpM für 15 min zentrifugiert wurde, wird das Pellet mit 25 ml P1 für 20 min bei RT resuspendiert. Nach Zugabe von 25 ml P2 wird höchstens 5 min inkubiert. Während der Inkubation erfolgt eine Durchmischung durch vorsichtiges Schwenken. Nach Zugabe von 25 ml P3 (RT) und vorsichtigem Umschwenken erfolgt eine 45 min Inkubation auf Eis. Abschließend wird 40 min bei 4°C/13000 UpM zentrifugiert.

Die Säulen werden mit 2 ml Equilibrierungspuffer equilibriert, die Faltenfilter befeuchtet und der klare Überstand nach der Zentrifugation über den Filter gegeben. Der Durchlauf wird anschließend erneut auf die Säule gegeben. Danach wird mit je 4 ml Waschpuffer dreimal gewaschen und abschließend zweimal mit je 3 ml, auf 50°C vorgewärmten, Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wird mit 0,8 Vol. Isopropanol gefällt. Nach der Zentrifugation bei 4°C/15000 UpM für 30 min wird mit 10 ml 70% Ethanol gewaschen. Es folgt erneut eine 20 minütige Zentrifugation. Der entstandene Niederschlag wird 10 min an der Luft getrocknet und dann in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt am Fluorometer.

#### 4.5.4. DNA-Rückgewinnung aus Gelen

##### „QIAquick“ Gel Extraktions Kit

Das Prinzip der Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Anschließend wird die DNA mit TE oder H<sub>2</sub>O eluiert.

Die zu isolierende Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen über eine Säule gereinigt.

#### 4.5.5. Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen

##### Quick-HMW-DNA (nach Ramirez-Solis et al., 1995)

„Modified Bradleys“: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5%

---

### SDS, 1 mg/ml Proteinase K

Konfluent gewachsene Zellen einer mittleren Kulturplatte werden mit PBS gewaschen, gegebenenfalls mit einem entsprechenden Agens modifiziert und mit 1,5 ml der Proteinase K-Lösung versetzt. Nach Überführen der Lösung in 15 ml Falconröhrchen inkubiert man sie über Nacht bei 55°C. Anschließend wird die DNA durch vorsichtige Zugabe von 100% Ethanol mit 75 mM NaAc ohne Schütteln 2-3 Stunden bei Raumtemperatur präzipitiert. Durch vorsichtiges Schwenken und einem anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1800 UpM wird die DNA pelletiert. Danach erfolgen 2 Waschschrte, bei denen das DNA Pellet mit 1 ml 70% Ethanol für 30 min stehengelassen und anschließend wie beim ersten Mal abzentrifugiert wird. Nach dem zweiten Waschschrte läßt man das DNA-Pellet für 10 min bei Raumtemperatur trocknen und nimmt dann die DNA in 30-100 µl TE auf. Die Lösung wird noch einige Zeit bei 37°C geschüttelt. Danach erfolgt eine Konzentrationsbestimmung am Fluorometer. Die so erhaltenen kann direkt für einen Restriktionsansatz und anschließenden Southern-Blot-Analysen oder in einer LM-PCR eingesetzt werden.

## 4.6. DNA-Modifizierung

### 4.6.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA in einer Konzentration von bis zu 1 µg/µl wird in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der angegebenen Temperatur (zumeist 37 °C) gespalten.

### 4.6.2. Modifizierung mit KMnO<sub>4</sub>

Puffer A: 15 mM Tris/HCl pH 7,5

15 mM NaCl

60 mM KCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 mM EGTA

300 mM Sucrose

Stop-Puffer: 50 mM EDTA

1% SDS

0,4 M DTT

2 mg/ml Proteinase K

10% Piperidin

Modifizierung von Zellen (*in vivo*):

Subkonfluent gewachsene Zellen einer mittleren Zellkulturplatte werden mit PBS gewaschen und

1,5 ml Puffer A hinzugegeben. Anschließend wird die gewünschte  $\text{KMnO}_4$ -Menge aus einer 200 mM Stammlösung hinzu pipettiert, gut verteilt und 1 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 1,5 ml Stop-Puffer beendet man die Reaktion und lysiert die Zellen. Die HMW-Aufarbeitung erfolgt wie in Abschnitt 4.5.5. beschrieben.

Modifizierung von HMW oder Plasmid-DNA (*in vitro*):

Die zu modifizierende DNA Menge wird gefällt, nach Zentrifugation gewaschen und in 50  $\mu\text{l}$  Puffer A aufgenommen. Die gewünschte Menge  $\text{KMnO}_4$  wird zugesetzt, 1 min bei RT inkubiert, und durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Stop-Puffer wird die Reaktion beendet. Durch eine anschließende Fällung wird die DNA aufgereinigt.

Um die mit  $\text{KMnO}_4$  modifizierte DNA in analytischen Methoden weiterzuverwenden erfolgt nach DNA-Aufarbeitung ein Nachschnitt mit Piperidin. Hierfür wird die DNA nach dem Fällungsschritt in 10% Piperidin aufgenommen und für 30 min bei 90°C inkubiert. Hierbei muß darauf geachtet werden, daß die DNA vollständig gelöst ist. Anschließend wird die DNA erneut gefällt, nach der Zentrifugation in 20  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst und in der „Speed vac“ wieder vollständig getrocknet. Dieser Schritt dient der vollständigen Entfernung jeglicher Piperidinreste und ist für folgende Charakterisierungsschritte sehr wichtig. Die nun einzelsträngige DNA wird in 10-50  $\mu\text{l}$  TE oder Wasser gelöst und kann nur für die LM-PCR-Prozedur verwendet werden.

#### 4.6.3. Modifizierung mit S1 Nuklease

S1-Puffer: 80 mM NaOAc, 200 mM NaCl, 4 mM  $\text{ZnCl}_2$ , pH 4,5-5,5

Stop-Puffer: 0,2 M Tris/HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA

Die zu modifizierende Menge an DNA wird gefällt und das Pellet in 25  $\mu\text{l}$  S1-Puffer aufgenommen. Man startet die Reaktion durch Zugabe der entsprechenden Menge S1 Nuklease in 25  $\mu\text{l}$  S1 Puffer und inkubiert 10 min bei Raumtemperatur. Danach werden 100  $\mu\text{l}$  Stop-Puffer hinzu pipettiert, die Lösung wird gefällt und in TE aufgenommen.

#### 4.6.4. Modifizierung mit Bromazetaldehyd (BAA) und Chlorazetaldehyd (CAA)

Reaktionspuffer: 30 mM NaOAc, 0,15 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM  $\text{ZnCl}_2$ , 1 mM Butyrat; pH 5,5-6,5

Stop-Puffer: 0,2 M Tris/HCl pH 8,5, 0,1 M EDTA, 1% SDS, 2 mg/ml Proteinase K

Das Protokoll zur Modifizierung von Zellen oder DNA mit BAA/CAA entspricht dem zur Modifikation mit  $\text{KMnO}_4$  in Abschnitt 4.6.2. beschriebenen Protokoll. Die Inkubation mit den Modifikations-Agenzien erfolgt bei 37°C für mindestens 30 min. Bei der Modifizierung *in vivo* ist dabei zu beachten, daß die Kulturschalen sehr gut verschlossen in den Inkubator gestellt

werden sollten, da BAA/CAA extrem giftige, flüchtige Substanzen sind.

Nach der Modifizierung ist auch hier eine Nachbehandlung mit 10% Piperidin erforderlich.

#### 4.6.5. Modifizierung mit DNase I

(optimiert nach Methods in Molecular Biology, Vol 119: Chromatin Protocols; Kapitel 26)

PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
pH 6,8 - 7,0 mit 1 N NaOH einstellen; bei 4 °C lagern

DNaseI-Puffer: 15 mM Tris-HCl, pH 7,5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  
mM EGTA, 1,0 mM DTT, 0,3 mM Spermin, 1,0 mM Spermidin, 0,2 mM  
PMSF, 300 mM Sucrose, 0,1%-0,4% NP-40

Vor Gebrauch 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zusetzen

6x Lysispuffer: 6% SDS, 300 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM EDTA

Prot.K-Lösung: 20 mg/mL

Abtrypsinisierte Zellen werden bei 500 UpM für 5 min zentrifugiert und nacheinander mit PBS und DNaseI-Puffer gewaschen. Die Modifizierung kann auch direkt an mit PBS gewaschenen noch an der Kulturschale haftenden Zellen erfolgen.

Nach Zugabe einer genügenden Menge an Modifizierungs-Puffer werden sie mit unterschiedlichen DNase I-Konzentrationen bei 37°C für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 0,4-1 Vol Lysispuffer und 0,024 Volumen Proteinase-K (20mg/mL) erfolgt der Prot.K-Verdau über Nacht bei 55°C.

Die HMW-DNA wird wie oben beschrieben aufgearbeitet und zur Southern-Analyse oder für eine LM-PCR eingesetzt.

#### 4.6.6. Modifizierung mit VP16 (Topoisomerase II-Inhibitor)

PBS

20 mM VP16 in DMSO

TEP (Trypsin, EDTA, PBS)

Die logarithmisch wachsenden, nicht konfluenten Zellen einer mittleren Zellkulturplatte werden mit PBS gewaschen, abtrypsinisiert, zentrifugiert, in 1 ml Medium aufgenommen und in 2,2 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach Zugabe verschiedener Mengen an VP16 wird bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach werden die Zellen durch Zugabe einer 2x konzentrierten „Modified Bradleys“-Lösung lysiert und wie in Abschnitt 4.5.5. beschrieben aufgearbeitet.

#### 4.6.7. Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

10x Klenow-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM DTT

dNTP-Mix: dATP, dCTP, dTTP, dGTP je 3 mM in Wasser

In einem Reaktionsansatz von 30 µl werden bis zu 1 µg gespaltene DNA mit 4 µl Nukleotid-Mix und 1-2 U des Klenow-Enzyms in 1x Klenow-Puffer bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 µl 0,5 mM EDTA gestoppt und die DNA durch Fällung gereinigt.

#### 4.6.8. Dephosphorylierung

10x Phosphatase-Puffer: 500 mM Tris/HCl, pH9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM Spermidin

Um bei einer Ligation die Religation des Vektors zu verhindern, werden überstehende 5'-oder 3'-Enden der DNA Fragmente mit alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase = CIP) dephosphoryliert. Dazu wird in einem Reaktionsansatz von 100 µl Endvolumen 10 µl 10x Phosphatase-Puffer und 20-100 pmol überstehende Enden mit 1-2 U Phosphatase 15 min bei 37°C und anschließend weitere 15 min bei 56°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wird kurz auf Eis gestellt und nach Zugabe von weiteren 1-2 U Enzym wird der Vorgang wiederholt. Die Reaktion wird durch Hitzeinaktivierung gestoppt und die DNA danach mit 9,6 M LiCl in Ethanol präzipitiert.

#### 4.6.9. Ligation zur Transformation

5x Ligasepuffer: 250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% (w/v) PEG 8000, 5 mM dATP, 5 mM DTT

Ligation eines Inserts

Ca. 20 fmol gespaltener und u.U. dephosphorylierter Vektor wird mit ca. 60 fmol Insert in 1 µl 1x Ligasepuffer mit 2 U T4 DNA Ligase für mindestens 4 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 0,5 mM EDTA gestoppt.

### 4.7. Charakterisierung von Nukleinsäuren

#### 4.7.1. „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

(Saiki et al., 1988; Anwendungsbeispiele: Innis et al., 1990)

10xPCR-Puffer (Perkin Elmer)

Taq-Polymerase (5 U/µl, Perkin Elmer)

dNTP-Mix: je 10 mM aller vier Nukleotide (100 mM Stammlösungen; Pharmacia)

Mineralöl (Perkin Elmer)

Die Polymerase Ketten Reaktion ist eine einfache aber effiziente Methode zur Vermehrung eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen). Dazu muß lediglich die Sequenz der Grenzen des Segments zum Design geeigneter Oligonukleotidprimer bekannt sein. Ein PCR-Zyklus besteht aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Inkubationsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen: die doppelsträngige DNA wird zunächst bei einer hohen Temperatur denaturiert, danach erfolgt bei einer niedrigen Temperatur die Bindung der Primer, die komplementär zu den jeweiligen 3'-Grenzen des Zielsegments sind, dann werden diese durch eine DNA-Polymerase bei einer intermediären Temperatur verlängert. Die Verwendung von thermostabilen Polymerasen erlaubt die häufige Wiederholung dieses Zyklus ohne erneute Zugabe des Enzyms. In den meisten Fällen verwendet man die sogenannte Taq-Polymerase von *Thermophilus aquaticus*.

Es gibt allerdings noch eine Reihe anderer möglicher Enzyme, die bei speziellen Anforderungen zum Einsatz kommen. So verwendet man zusätzlich Polymerasen mit „proof reading“ Aktivität, wenn die Fehlerquote in der Sequenz des Amplifikats sehr niedrig sein soll. Ein solches Korrekturleseenzym überprüft die von der Taq-Polymerase synthetisierten Sequenzen und verbessert eingebaute Fehler, was die Fehlerhäufigkeit auf 1/10 verringert. Mit einem solchen System können PCR-Produkte aus genomischer DNA bis zu einer Größe von 15 kbp amplifiziert werden. Ein derartiges System findet in der Expand™ Long Template PCR (Roche Pharma) seine Anwendung. Hier wird die Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* als Korrekturleseenzym eingesetzt.

Ein alternatives System stellt die *Pfu* (Statagene) aus *Pyrococcus furiosus* dar. Auch hierbei handelt es sich um ein multifunktionelles Enzym mit einer 5'-3' Polymerase- und einer 3'-5' „proofreading“ Exonuklease-Aktivität. Die Amplifikationsprodukte besitzen außerdem keine A-Überhänge, wie sie die Taq produziert, sondern sind „blunt end“. Auch die Vent-Polymerase aus *Thermococcus litoralis* wird benutzt, wenn keine A-Überhänge auftreten dürfen.

Da während der PCR theoretisch bei jedem Zyklus nur die betreffende Sequenz verdoppelt wird, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg ihrer Konzentration, so daß am Ende eine bis zu  $10^9$ -fache Vermehrung des gewünschten Segments erreicht werden kann.

Ein typischer Reaktionsansatz wird in speziellen PCR-Reaktionsgefäßen folgendermaßen zusammengestellt:

1. Destilliertes, autoklaviertes Wasser wird so vorgelegt, daß ein Endvolumen von 40 µl erreicht wird.
2. 4 µl 10x PCR-Puffer
3. 0,5 µl dNTP-Mix

4. jeweils 20 bis 100 pmol der beiden Primer

Diese Reaktionsvorlage wird gegebenenfalls mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten der Flüssigkeit während der Temperaturzyklen zu verhindern. Dies ist nicht notwendig, wenn ein PCR-Gerät mit Deckelheizung zur Verfügung steht. Die Gefäße werden dann in den PCR-Heizblock überführt. Die Bohrungen des Gerätes können leicht mit Mineralöl befeuchtet werden, um einen optimalen Temperaturübergang zu gewährleisten. Nach dem Initiations-schritt (s.u.) Wird die Reaktion durch Zufügen von:

5. 10 µl Taq-Polymerase (1,25 U in 1x PCR-Puffer)

Ein typisches Temperaturprofil beginnt zunächst mit einem initialen DNA-Denaturierungsschritt (4-6 min, 95EC). Dieser Schritt sollte nie ausgelassen werden, da die Anwesenheit der Polymerase bei niedrigeren Temperaturen bereits zu einer Verlängerung von fehlhybridisierenden Primern führt, die dann bei den folgenden Amplifikationszyklen als korrekte Templates benutzt werden und zu falschen Produkten führen. Danach wird auf 72EC abgekühlt und die Polymerase hinzugefügt. Nun schließen sich die Temperaturzyklen an, die typischerweise 25- bis 35-mal wiederholt werden:

- |    |          |       |
|----|----------|-------|
| 1. | 95°C     | 1 min |
| 2. | 40°-60°C | 1 min |
| 3. | 72°      | 2 min |

Zu diesem generalisierten Versuchsprotokoll müssen noch einige Anmerkungen gemacht werden, da eine erfolgreiche Versuchsdurchführung von vielen Parametern abhängig ist und häufig einer auf die jeweilige Anwendung bezogenen Optimierung bedarf:

- Da sich die PCR-Methode zum Nachweis extrem geringer Konzentrationen spezifischer Sequenzen eignet, ist sie aber auch sehr anfällig gegen Kontaminationen mit anderen DNAs. Es muß daher auf möglichst langsames, aerosolfreies Pipettieren geachtet werden. Soweit wie möglich sollten aller verwendeten Lösungen vorher autoklaviert werden.
- Die angegebenen Konzentrationen sollten sehr genau eingehalten werden. Es empfiehlt sich daher, zunächst eine Reaktionsstammlösung anzusetzen und diese dann auf die einzelnen Proben zu verteile, um Pipettierfehler zu minimieren.
- Die optimale Magnesiumkonzentration muß für jedes Primerpaar empirisch ermittelt werden. Ein Über- oder Unterschuß kann die Amplifikationseffizienz reduzieren oder zu unspezifischen Produkten führen.
- Der Nukleotid-Mix sollte nur aus vorneutralisierten Stammlösungen der Firmen Pharmacia,



Roche Pharma oder USB zusammengestellt werden.

- Die einzelsträngigen Oligonukleotid-Primer sollten 15 - 30 bp lang sein und besonders an ihrem 3'-Ende keine Komplementarität zu sich selbst oder zueinander aufweisen. Für eine maximale Spezifität sollte der GC-Gehalt bei etwa 50% liegen. Die Konzentration an Primern kann in dem angegebenen Bereich variieren; entscheidend ist, daß beide Primer in äquimolarem Verhältnis vorliegen. Das selbe gilt für das Verhältnis der vier Nukleotide zueinander.

- Die Dauer der einzelnen Schritte der Temperaturzyklen kann leicht verändert werden. Die Laufzeit des Elongationsschrittes richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Man geht etwa von 1000 bp / min Synthesegeschwindigkeit aus. In vielen Fällen schließt man den Temperaturzyklen noch einen einzelnen Elongationsschritt von 10 min bei 72°C an, um ein Fertigstellen noch nicht beendeter Sequenzen zu ermöglichen.

#### 4.7.2. "Ligation-mediated Polymerase Chain Reaction" (LM-PCR)

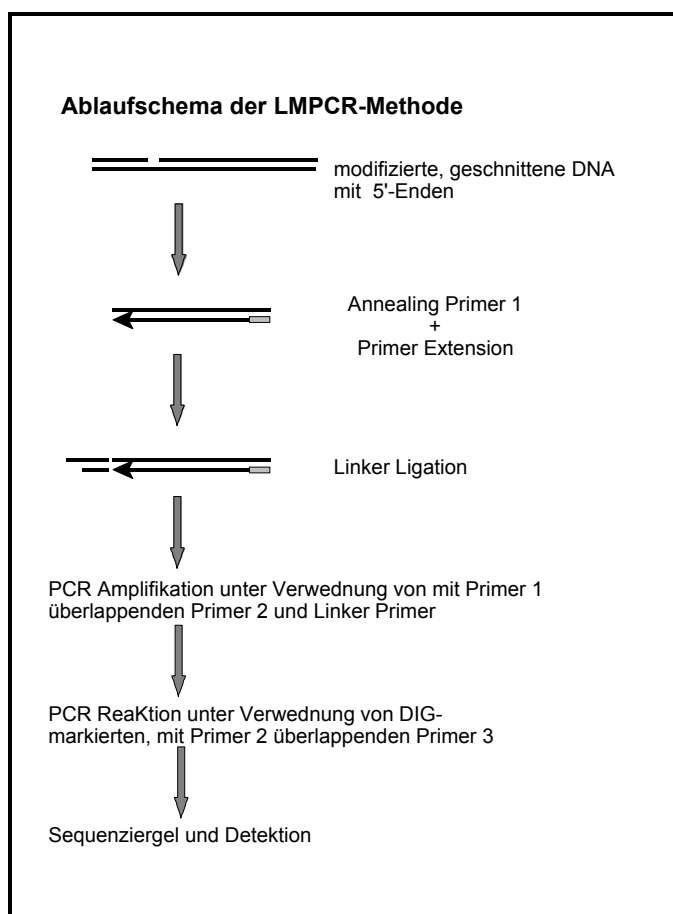
Um nach der *in vivo* Modifikation der DNA die Veränderungen auf dem Nukleotid-Level sichtbar zu machen, wird eine LM-PCR durchgeführt. Voraussetzung für die Anwendung dieser

Methode ist, daß die nachzuweisende Modifizierung der DNA zu einem Strangbruch führt, oder daß die Modifizierung die DNA derart verändert, daß eine Polymerase nicht über die Modifizierungsstelle hinweg lesen kann.

Die LM-PCR besteht aus in 3 Arbeits-Abschnitten:

1. Primer-Extension
2. Ligation des Linkers
3. PCR-Amplifikation

Bei der Primer-Extension wird nach Bindung eines sequenzspezifischen Primers ein neuer DNA-Strang durch die zugegebene T7 Sequenase 2.0 (USB) synthetisiert. Die Polymerase bricht an der modifizierten Stelle ab und es entstehen „blunt-Enden“. Bei



**Abb.4.1:** Schematische Darstellung einer LM-PCR

der folgenden Ligation wird an diese „blunt-Enden“ ein doppelsträngiger Linker ligiert. Anschließend werden die resultierenden Fragmente in einer PCR-Reaktion amplifiziert, wobei bei den letzten Schritten ein Digoxigenin-markierter Primer verwendet wird. Die entstehenden markierten PCR-Fragmente werden nun in einem Sequenziergel aufgetrennt, und mittels der in den Nachbarspuren aufgetragenen Sequenzierleiter kann dann anhand der Länge des Fragmentes die genaue Position der ursprünglichen Modifizierungsstelle ermittelt werden.

Bei der Wahl der Primer ist zu beachten, daß der GC-Gehalt der verwendeten Primer etwa gleich bleibt, daß die Primer in einem stabilen Chromatinbereich binden und daß die Annealing-Temperatur innerhalb eines Primer-Sets (bestehend aus drei überlappenden Primern) ansteigt. Die verwendeten Annealing-Temperaturen sollten 4-5°C unter der Schmelztemperatur der Primer angesetzt werden.

In Abb. 4.1. ist Ablauf einer LM-PCR schematisch gezeigt.

### Primer-Extension

5x Sequenase-Puffer (USB):	200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 250 mM NaCl
Sequenase-Verdünnungspuffer (USB):	50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
T7 Sequenase 2.0 (USB)	
Primer I:	0,3 pmol/ $\mu$ l
Mg <sup>2+</sup> -dNTP-Mix:	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM DTT, 0,25 mM dNTP, H <sub>2</sub> O für ein Endvolumen von 7,5 $\mu$ l pro Ansatz
Tris-HCl:	300 mM, pH 7,5

Zu 10  $\mu$ l Probe (2,5  $\mu$ g DNA) werden 3  $\mu$ l 5x Sequenase-Puffer und 2  $\mu$ l Primer I pipettiert. Die DNA wird 3 min bei 95°C denaturiert und für 30 min bei der errechneten Annealing-Temperatur inkubiert. Nach Zugabe von 7,5  $\mu$ l Mg<sup>2+</sup>-dNTP-Mix und 1,5  $\mu$ l Sequenase 2.0 (1:8 verdünnt in Sequenase-Verdünnungspuffer) wird für 15 min bei 45°C inkubiert. Danach werden 6  $\mu$ l Tris/HCl hinzupipettiert und für 15 min bei 67°C Hitze-inaktiviert. Vor der Zugabe des Ligationmixes, werden die Proben auf Eis gestellt.

### Ligation

Linker:	25mer (20 pmol/ $\mu$ l) + 11mer (20 pmol/ $\mu$ l) in 250 mM Tris-HCl, pH 7,5
Ligationmix:	13,33 mM MgCl <sub>2</sub> , 30 mM DTT, 1,66 mM ATP, 83 pg/ $\mu$ l BSA, 2 pmol/ $\mu$ l Linker, 0,06 U/ $\mu$ l T4 Ligase, H <sub>2</sub> O für ein Endvolumen von 45 $\mu$ l pro Ansatz

Ligation-Stop-Mix: 1,06 µg/µl *E.coli* tRNA (Roche), 2,68 µM NaOAc, H<sub>2</sub>O für ein Endvolumen von 9,4 µl pro Ansatz

45 µl Ligationsmix werden in den Ansatz gegeben, und die Ligation erfolgt über Nacht bei RT. Nach Hitze-Inaktivierung für 10 min bei 70°C werden 9,4 µl Ligations-Stop-Mix zupipettiert. Die DNA wird durch Zugabe von 100 µl abs. Ethanol gefällt, bei 14000 UpM zentrifugiert, das Pellet gewaschen und dann in 40 µl PCR-Mix aufgenommen.

## PCR

### PCR I

10x Vent-Polymerase-Puffer (NEB)

PCR-Mix pro Ansatz:

- 4 µl 10x Vent-Polymerase-Puffer
- 1 µl MgSO<sub>4</sub> (150 mM, NEB)
- 2 µl PrimerII (10 pmol/µl)
- 2 µl Linker-Primer 25mer (10 pmol/µl)
- 0,5 µl BSA (10 mg/ml, NEB)
- 30,5 µl H<sub>2</sub>O

Die 40µl-Reaktionsvorlage wird mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten der Flüssigkeit während der Temperaturzyklen zu verhindern, und dann in den PCR-Heizblock überführt. Die Bohrungen des Gerätes sollten leicht mit Mineralöl befeuchtet sein, da ein optimaler Temperaturübergang von großer Bedeutung für einen effizienten Reaktionsablauf ist. Bei der Verwendung einer PCR-Maschine mit Deckel-Heizung entfällt die Benutzung von Mineralöl. Nach dem Initialschritt („hot start“) wird die Reaktion durch Zufügen von 10 µl Polymerase-Mix gestartet.

Polymerase-Mix:

- 1 µl 10x Vent-Polymerase-Puffer (NEB)
- 1,25 µl Vent-Polymerase (5U/µl, NEB)
- 1 µl dNTP (10 mM-Mix, Pharmacia)
- 6,75 µl H<sub>2</sub>O

PCR-Programm:

1. 95°C	4 min
2. 72°C	5 min
3. 95°C	30 s
4. Annealing	2 min
5. 72°C	3 min; Schritte 3 bis 5 werden 26x wiederholt
6. 72°C	7 min

7. 15°C      1 min

## PCR II

Bei der zweiten PCR werden DIG-markierte Primer verwendet. Im Reaktionsmix werden nur diese Primer vorgelegt. Als zweiter Primer dient der noch in dem PCR-Amplifikat aus PCR I vorhandene Linker-Primer 25mer.

PCR-Mix:      10 µl PCR-Amplifikat aus PCR I  
                 2 µl Primer III (DIG-markiert, 1 pmol/µl)  
                 0,5 µl dNTP (10 mM)  
                 0,5 µl Vent-Polymerase (5U/µ)  
                 1 µl 10x Thermopol-Puffer  
                 6 µl H<sub>2</sub>O

PCR-Programm:      1. 95°C      2 min  
                                 2. 95°C      30 s  
                                 3. Annealing      3 min  
                                 4. 72°C      5 min; Schritte 2 bis 4 werden 5x wiederholt  
  
                                 5. 72°C      5 min  
                                 6. 15°C      1 min

Die Reaktion wird durch Zugabe von 80 µl Vent-Stop-Mix beendet. Nach einer optionalen Phenol-Chlorophorm-Extraktion wird die DNA gefällt und nach Pelletierung in 5 µl TE und 2 µl Stop-Puffer aufgenommen. Vor der Zugabe von Stop-Puffer kann 1 µl der Lösung für eine fluorometrische Konzentrations-Bestimmung eingesetzt werden. In diesem Fall ist ein Konzentrations-Abgleich vor dem Auftragen auf das Sequenziergel möglich.

Vent-Stop-Mix:      0,3 M NaOAc, 0,1 µg/µl tRNA

Stop-Puffer:      95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau,  
                         0,05 % Xylencyanol

### 4.7.3. Sequenzierung von DNA

Die enzymatische Sequenzierreaktion nach Sanger et al. (1977) beruht auf einem nukleotidspezifischem Kettenabbruch durch den Einbau eines didesoxy-Nucleotids.

(modifiziert nach DIG-Cyclesequencing Protokoll, Roche Pharma)

10x Reaktionspuffer: 200 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl

Taq DNA Polymerase: 3 U/ $\mu$ l

ddATP/dGTP-Terminationsmix: 25  $\mu$ M dGTP, 25  $\mu$ M dATP, 25  $\mu$ M dCTP, 25  $\mu$ M dTTP,  
850  $\mu$ M ddATP, 950  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>

ddCTP/dGTP-Terminationsmix: 25  $\mu$ M dGTP, 25  $\mu$ M dATP, 25  $\mu$ M dCTP, 25  $\mu$ M dTTP,  
400  $\mu$ M ddCTP, 500  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>

ddGTP/dGTP-Terminationsmix: 25  $\mu$ M dGTP, 25  $\mu$ M dATP, 25  $\mu$ M dCTP, 25  $\mu$ M dTTP,  
75  $\mu$ M ddGTP, 175  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>

ddTTP/dGTP-Terminationsmix: 25  $\mu$ M dGTP, 25  $\mu$ M dATP, 25  $\mu$ M dCTP, 25  $\mu$ M dTTP,  
1275  $\mu$ M ddTTP, 1370  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>

Stoppuffer: 95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau,  
0,05 % Xylencyanol

2,5  $\mu$ g Plasmid-DNA, 2  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer und 1  $\mu$ l Primer3 (DIG-markiert, 1 pmol/ $\mu$ l) werden mit H<sub>2</sub>O auf 19  $\mu$ l aufgefüllt. 1  $\mu$ l Taq-Polymerase wird zugegeben und je 4  $\mu$ l des DNA-Mixes zu je 2  $\mu$ l Nukleotidmix pipettiert. Im Gegensatz zum klassischen Sequenzierverfahren nutzt man beim „Cyclesequencing“ die Vorteile der PCR. Durch das Durchlaufen mehrerer Zyklen von Denaturieren, Annealing und Elongation wird die Sensitivität erhöht. Das verwendete PCR-Programm lautet wie folgt:

1. 5 min 95°C
2. 30 s 95°C
3. 30 Annealing
4. 1 min 72°C; die Schritte 2 bis 4 werden 30x wiederholt
5. 7 min 72°C

Nach Ablauf des Programms wird die Reaktion durch Zugabe von 2  $\mu$ l Stoppuffer beendet. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wird die DNA für 3 min bei 95°C denaturiert und dann sofort auf Eis abgekühlt. Es werden 5-7  $\mu$ l des Reaktionsansatzes auf einem denaturierenden Sequenziergel getrennt, auf eine Membran geblottet und detektiert (s.5.8.2).

## 4.8. Gelelektrophorese

### 4.8.1. Agarose Gelelektrophorese

#### 4.8.1.1. Native Agarose Gelelektrophorese

Laufpuffer (TAE): 40 mM Tris/Acetat (pH 7,5)  
20 mM NaOAc; 1 mM EDTA

---

5 x Ladepuffer:	15 % Ficoll
	50 mM EDTA
	1 x TAE
	0,05 % Bromphenolblau
	0,05 % Xylencyanol

Zur Anfertigung eines 1%igen Standardgels wird 1g Agarose in 100ml Laufpuffer aufgenommen und in einem Mikrowellenherd so lange gekocht, bis keine sprudelnde Blasenbildung mehr zu beobachten ist. Dann wird die flüssige Agarose mit 3 µl Ethidiumbromid (5mg/ml) vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Zur Formung der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wird das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit  $\frac{1}{5}$  Volumen des 5 x Ladepuffers versetzt. Für die Erkennung der Größe eines Fragmentes werden Größenstandards parallel mit aufgetragen. Die

Elektrophorese wird bei ca. 100V und 30 mA durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente werden die DNA-Banden nach 4-18-stündiger Laufzeit fotografiert. Für die präparative Gewinnung der DNA-Fragmente können die Banden unter UV-Licht (360 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Zum Nachweis sehr kleiner DNA-Fragmente steht hochgereinigte sog. NuSieve™-Agarose zur Verfügung, die die Herstellung von 10%igen Gelen mit einem Auflösungsvermögen von 20bp-Fragmenten ermöglicht.

#### **4.8.1.2. Denaturierende Agarose Gelelektrophorese**

Lauflösung: 50 mM NaOH, 1 mM EDTA

Ladelösung: 15% Ficoll, 50 mM EDTA, 50 mM NaOH, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanolblau

Eine denaturierende Agarose Gelelektrophorese wird zur Auftrennung einzelsträngiger DNA-Fragmente verwendet. Für ein 1%iges Gel wird 1 g Agarose in Wasser aufgenommen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Erst nach Abkühlung auf ca. 60°C wird aus einer 10 M NaOH- und einer 0,5 M EDTA-Stammlösung das entsprechende Volumen zur Einstellung der Endkonzentration von 50 mM NaOH und 1 mM EDTA zugegeben. Eine Benutzung von Ethidiumbromid ist nicht möglich, da keine Bindung dieses Farbstoffs an die DNA bei derart hohen pH-Werten erfolgt. Der Gellauf erfolgt bei 20 - 25 V über Nacht. Die Verwendung der angegebenen Lauflösung hat schon bei diesen Spannungswerten sehr hohe Stromstärken zur Folge. Der Nachweis der DNA erfolgt im Southern-Blot (Kap.4.10.2.).

### 4.8.2. Sequenziergele

10 x TBE Laufpuffer : 100 mM Tris/Borat (pH 8,3)

2,5 mM EDTA

Harnstoff

Acrylamid/Bis-Acrylamid (38/2)

TEMED

10% Ammoniumpersulfat (APS)

10 M NaOH

#### 4.8.2.1. Vorbereitung der Apparatur

Damit sich nach Beendigung der Elektrophorese das Sequenziergel von den Glasplatten lösen läßt, werden sie zunächst sorgfältig mit einem fettlösenden Geschirrspülmittel und einem weichen Schwamm gewaschen, mit Wasser abgespült und dann mit Ethanol trockengerieben. Fussel, die sich jetzt noch auf den Platten befinden, können mit einem Papiertuch, das mit Isopropanol angefeuchtet wurde, entfernt werden. Es ist sehr wichtig, daß beim Trennen der Glasplatten nach der Elektrophorese das Gel nur auf einer Platte haften bleibt. Deshalb wird eine Platte nach etwa jedem zehnten Lauf mit 10 M NaOH behandelt. Dies begünstigt weiterhin ein gleichmäßigeres Gießen des Gels.

#### 4.8.2.2. Gießen des Gels

Für ein Sequenziergel wird zunächst folgende Lösung angesetzt, etwas erwärmt und wieder auf RT abgekühlt: 40g Harnstoff, 8ml 10xTBE und 25 ml dH<sub>2</sub>O. Nach Zugabe von 12 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (38/2) wird mit dH<sub>2</sub>O auf 80 ml aufgefüllt. Die Lösung wird mit Hilfe einer Vakuumpumpe filtriert und dabei entgast. Mit 35 µl TEMED und 350 µl 10%igem APS wird die Polymerisation gestartet. Die Lösung kann man nun mit Hilfe einer großen Pipette zwischen die zusammengesetzten, waagrecht auf einer Unterlage liegenden Glasplatten einlaufen lassen.

#### 4.8.2.3. Lauf

Nach mindestens einer Stunde Polymerisationszeit sollte das Gel bei 55 Watt ca. 60 min vorlaufen. Der eigentliche Lauf wird ebenfalls bei 55 Watt durchgeführt bis die Xylencyanolblaubande unten angekommen ist.

Nach dem Lauf wird das Gel auf Whatman 3MM Papier überführt und wenn DIG-markierte Proben verwendet wurden für 90 min bei 1,8 A auf eine positiv geladene Membran geblottet. Für den Elektrotransfer werden 2 Lagen Whatmann 3MM Papier mit 0,5x TBE angefeuchtet und luftblasenfrei auf die untere Elektrodenplatte der Blottapparatur gelegt. Darauf bringt man

ebenfalls luftblasenfrei das Gel und die Membran. Der Aufbau wird mit 2 Lagen feuchte Whatman 3MM Papier vervollständigt. Die obere Elektrodenplatte wird angeschlossen und der Transfer durch anlegen der Spannung gestartet. Danach wird die Membran kurz getrocknet und kann zur Detektion eingesetzt werden.

Wurden in Gel radioaktiv markierte Proben aufgetrennt, wird das Gel auf Whatman 3MM Papier für 1 - 2 h bei 80°C auf einem Gelrockner getrocknet und über Nacht exponiert.

#### **4.9. Detektion DIG-markierter DNA - Nicht-radioaktive Nachweismethoden**

Zur Detektion wird das "DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids" der Fa. Boehringer (Roche Pharma) genutzt.

Der Verbrauch an Reagenzien wird durch Verwendung von Plastikbeuteln, in welche die Blots eingeschweißt werden, minimiert.

Maleinsäure-Puffer: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl; pH auf 7,5 mit NaOH-Plätzchen einstellen

Wasch-Puffer: Maleinsäure-Puffer mit 0,3% (v/v) Tween® 20

10x Blocking-Lösung: 10% (w/v) Blocking-Reagenz in Maleinsäure-Puffer; Lösen des Reagenz erfolgt durch vorsichtiges Erwärmen in der Mikrowelle oder auf einer Heizplatte.

Detektions-Puffer: 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5

Die trockene Membran wird zu Beginn in Waschpuffer geschwenkt, um Harnstoff- und Gelreste zu entfernen. Danach erfolgt das Blocking nicht besetzter Membranbereiche mit 1x Blocking-Lösung für 30 min. Der anti-Digoxigenin-Antikörper wird 1:10000 in 1x Blocking-Lösung für 30 min auf die Membran gegeben. Anschließend werden durch 2 Waschschrte für 20 min mit Wasch-Puffer nicht gebundene Antikörper entfernt. Nach einer kurzen Äquilibration mit Detektionspuffer gibt man das Substat CSPD® 1:1000 verdünnt in Detektionspuffer für 5 min auf die Membran. Das Substrat wird durch die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase unter Lumineszenz umgesetzt. Der Blot wird kurz getrocknet und exponiert. Die Expositionszeiten liegen zwischen 30 und 90 min.

#### **4.10. Radioaktive Nachweismethoden**

##### **4.10.1. Markierung von DNA**

##### **Random priming mit "Rediprime DNA Labelling System"**

Labelling Mix



(Fa. Amersham Life Science) : dATP, dGTP, dTTP, exonucleasefreies Klenow-Enzym, Oligonukleotidprimer (9mer)

25-50 ng DNA werden in einem Endvolumen von 45 µl in einem Eppendorfgefäß für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz in den Labelling Mix pipettiert, gemischt und nach Zugabe von 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol) für ca. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die nicht eingebaute Nukleotide werden über eine Sephadex-Säule abgetrennt.

#### **4.10.2. „Southern Blotting“**

(Southern, 1975)

##### **4.10.2.1. Transfer**

10-15 µg der aufgereinigten, hochmolekularen DNA werden mit 10 µl des jeweiligen 10fachen Restriktionspuffers, 1 µl TE/RNase (10µg/ml) sowie 50 U des Restriktionsenzym versetzt und über Nacht im Gesamtvolumen von 100 µl bei 37°C inkubiert. Danach wird die DNA gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in einem Volumen von 40 µl TE aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl 6xProbenpuffer, wird die DNA elektrophoretisch in einem 1,0% TAE-Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard wird ein <sup>35</sup>S-markierter Verdau von Lambda-DNA verwendet. Bei all diesen Schritten ist es wichtig, auf eine intensive Durchmischung der eingesetzten, teilweise viskosen Lösungen zu achten. Ebenso sollten zur Elektrophorese nur frisch angesetzte Puffer verwendet werden.

Der Transfer der DNA vom Gel auf die positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membrane, Fa. Pall) erfolgt mit 0,4 M NaOH. Lange DNA-Fragmente (>5 kb) können vor dem Transfer mittels 0,25 M HCl (ca. 30 Minuten) depurinieren werden, so daß sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen und leichter aus dem Gel austreten können. Das Gel wird anschließend mit 0,4 M NaOH neutralisiert und in die Blotapparatur (z.B. eine Gelkammer) überführt: das Gel liegt mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier sollten ein Schwammtuch oder mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Berührung stehen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt, die zuvor in NaOH gewässert wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0,4 N NaOH angefeuchtetes und 5 Lagen trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. "Apura Swanex") die

Anordnung ab.

Die Apparatur wird vorsichtig mit einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Der Transfer sollte mindestens 6 Stunden, meist jedoch über Nacht erfolgen. Bei Durchfeuchtung sollte der Papiertapel gewechselt werden. Anschließend wird die Nylonfolie in 2x SSC neutralisiert und 30 min getrocknet. Nach der Trocknung kann die Membran zur Hybridisierung eingesetzt werden.

#### 4.10.2.2. Hybridisierung

(Church, G.M. et al 1989, leicht modifiziert)

Hybridisierungslösung 0,5M  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ , pH 7,2

+ Prähybridisierungslösung: 7 % SDS

2 mM EDTA

Waschlösung I: 40mM  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ , pH 7,2

1 % SDS

2 mM EDTA

Waschlösung II: 40mM  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ , pH 7,2

0,1 % SDS

2 mM EDTA

Waschlösung III: 100 mM  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ , pH 7,2

2 mM EDTA

#### Prähybridisierung und Hybridisierung

6 ml der Hybridisierungslösung werden in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungsofen gefüllt und die Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingelegt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 68°C im Hybridisierungsofen für mindestens 10 Minuten. Die denaturierte, radioaktiv markierte Probe, wird hinzugefügt und die Hybridisierung erfolgt bei gleichen Bedingungen über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht verletzt werden; auch sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden.

#### Waschen

Der Röhrcheninhalt wird in den radioaktiven Abfall entleert. Der erste Waschschrift erfolgt im Hybridisierungsröhrchen. Dann wird die Membran vorsichtig entnommen, die folgenden Waschschrift folgen im Wasserbad bei 68°C.

2x 5 Minuten mit Waschlösung I

1x 5 Minuten mit Waschlösung II

3x 5 Minuten mit Waschlösung III zur Entfernung von SDS-Resten

Anschließend kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden.

Trocknen der Membran führt zu irreversibler Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich.

### Rehybridisierung

Zur Rehybridisierung wird die Aktivität durch mehrfaches Waschen in 0,1% SSC / 0,1% SDS bei 95°C entfernt. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch anschließende Exposition sichergestellt. Erneute Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgen wie gehabt.

## 4.11. Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen

### 4.11.1. Verwendete Zelllinien

1. Ltk<sup>-</sup> Murine Fibroblastenzelllinie, Derivat der L929-Zelllinie (ATCC CCL1); stabile Zelllinie mit defektem Thymidinkinase-Gen (Kit et al., 1963)
2. 2<sub>4</sub> klonale Linie von mit pCosIFN $\alpha$  und pH79 2cos/tk kotransfizierten Ltk<sup>-</sup>-Zellen; enthält 100 Kopien der IFN $\alpha$ -Domäne (Hauser, 1982)
3. MG63 Humane Osteosarcomazelllinie (ATCC CRL1429)
4. Vero Nebennieren-Zelllinie vom Affen mit defektem Interferon-Locus (ATCC CCL-81); (Mosca, 1986)
5. FS4 primäre Fibroblastenzelllinie aus menschlichen Vorhautzellen (Vilcek 1973)

### 4.11.2. Medien und Lösungen

PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8 - 7,0 mit 1 N NaOH einstellen; bei 4 °C lagern.

TEP : 0,1-0,2% Trypsin-EDTA (Fa. Gibco) in PBS

Penicillin/Streptomycinlösung (100x) : 1,212 g Ampicillin / 200 ml (10000 U/ml), 2 g Streptomycin / 200 ml (10 mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, bei -20 °C lagern.

Glutaminlösung (100x) : 29,23 g Glutamin in 1 l lösen, bei -20 °C lagern

DME-Medium (Dulbecco's Modification of Eagles Medium)

Man füllt Milliporewasser in 10 l Steilbrustflaschen, gibt die erforderliche Menge Pulvermedium (DME-Pulver von Fa. Flow) dazu und rührt mit einem Rührkern, bis das Medium vollständig gelöst ist. Nach Zugabe von 1/100 Volumen 1 M HEPES und 3,75 g/l NaHCO<sub>3</sub> wird das Medium in sterile Flaschen filtriert. Die Flaschen werden zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen, und anschließend bei 4 °C gelagert. Die

Fertigstellung erfolgt bei Bedarf. Wenn nicht anders beschrieben, wird dem Medium kurz vor Gebrauch 10% FCS, 1/100 Volumen Glutaminlösung sowie 1/100 Volumen Penicillin/Streptomycinlösung zugesetzt und gut gemischt.

#### **4.11.3. Kultivierung von Zelllinien**

Die Zellen werden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem naßbegasteten Brutschrank kultiviert. Für die verwendeten Zelltypen wird DME-Medium mit 10% FCS, 20 mM Glutamin, 60 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

Je nach Zelldichte sollte alle 2 bis 5 Tage das Medium gewechselt werden. Sind die Zellen konfluent, werden sie umgesetzt (passagiert).

#### **4.11.4. Passagieren**

Die zu passagierenden Zellen werden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit einem dünnen Film TEP überschichtet. Nach einigen Minuten lösen sich die Zellen von der Oberfläche. Die Zellsuspension wird zur Inaktivierung des Trypsins in mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Mediums aufgenommen. Noch lose, auf dem Boden des Kulturgefäßes haftende, Zellen werden mit Hilfe einer Pipette abgespült. Ein Aliquot der Zellsuspension wird gezählt und die Zellen in der gewünschten Konzentration in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium ausgesät.

#### **4.11.5. Langzeitlagerung von Zellen**

Logarithmisch wachsende Zellen einer kleinen Flasche (ca.  $3 \times 10^6$  Zellen) werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEP abgelöst. Man nimmt die Zellsuspension in 4 ml Medium auf und zentrifugiert 5 min bei 1000 UpM. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 2 ml kaltem FCS mit 5% DMSO aufgenommen und auf 3 - 4 Einfrierröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) aliquotiert und sofort auf Eis gestellt.

Man beläßt die Röhrchen maximal 60 min auf Eis, verpackt sie in Zellstoff und lagert sie in Styroporkästen bei -70°C. Nach ca. 12 h können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Dazu erwärmt man die Röhrchen im 37°C Wasserbad und nimmt die Zellsuspension in 10 ml Medium auf, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wird 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine kleine Flasche überführt.

#### **4.11.6. Interferon-Induktion**

##### **4.11.6.1. Induktion mit Sendai-Virus**

Die Zellen auf zwei großen Zellkulturplatten und einer kleinen Flasche werden gründlich mit serumfreiem Medium gewaschen. Es wird serumfreies Medium mit  $2^{10}$  Units Sendai-Viren auf die Zellen gegeben und eine Stunde bei 37°C induziert. Das wird das Medium abgezogen und das Virus durch dreimaliges Waschen mit serumhaltigen Medium inaktiviert. Die Zellen auf den großen Platten werden noch 2 - 3 h mit serumhaltigen Medium inkubiert und danach bearbeitet. Die Zellen in der kleinen Flasche werden über Nacht inkubiert und für die Bestimmung des Interferontiters eingesetzt.

##### **4.11.6.2. Bestimmung des Interferon-Titers**

Färbelösung: 50 g Kristallviolett, 8,5 g NaCl, 143 ml 37%iges Formaldehyd, 500 ml Ethanol, mit Wasser aus 1 l auffüllen

Vero- oder FS4-Zellen werden auf Microtiterplatten in DME-Medium in einer Konzentration von etwas 1000 Zellen/Loch ausgesät, so daß die Platten am nächsten Tag konfluent bewachsen sind. Die zu testenden Überstände und mehrere 1:1 Verdünnungsstufen werden in die oberste Reihe der Platte gegeben. In eine weitere Reihe wird Medium mit einem Interferonstandard pipettiert und auch hier mehrere Verdünnungsstufen angelegt. Nach 24 h wird das Medium entfernt und je 100 µl einer Virussuspension (DME mit 5% FCS, 104 pfu VSV) pro Loch der Microtiterplatte werden auf die Zellen gegeben. Die durch Virusinfektion ausgelöste Lysis kann nach weiteren 24 h unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Der Virusüberstand wird abgenommen und mit 2,5%igem Formaldehyd inaktiviert. Die durch Interferon geschützten, noch lebenden Zellen werden mit der Kristallviolett-Färbelösung angefärbt und durch den Vergleich mit dem Interferonstandard wird der Interferontiter der Überstände bestimmt.

---

## 5. Abkürzungen und Zeichen

A	Adenosin
á	alpha
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
â	beta
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BUR	base-unpairing region
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cos	Cosmid; cos-Site innerhalb eines Cosmid-Vektors
Cre	causes recombination (Cre-Recombinase)
CUE	core unwinding element
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N steht für Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin)
ddNTP	Didesoxyribonukleotidphosphat
DHGP	Deutsches Humanes Genomprojekt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DME	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol

---

E	Enhancer
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(â-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES	Embryonale Stammzellen der Maus
F	Farad
Fa	Firma
FCS	foetales Kälberserum
fmol	Femtomol
g	Gramm
G	Guanin
ã	gamma
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMW-DNA	„high molecular weight“ DNA
HSS	DNase I-hypersensitive site
HUGO	Humanes Genomprojekt
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
kan	Kanamycin
kbp	1000 Basenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
ë	lambda
LCR	locus control region
LM-PCR	Ligation-mediated Polymerase Chain Reaction
lox P	locus of crossing over (Zielsequenz der Cre-Rekombinase)
LTR	long terminal repeat

---

M	molar
MAR	matrix-attached region
min	Minute
ml	Milliliter
mol	Mol
mM	millimolar
mRNA	messenger-RNA
ng	Nanogramm
NS	Nukleinsäuren
nm	$10^{-9}$ m
Ù	Ohm
ù	omega
ori	origin of replication
P	Promotor
p	Plasmid
PAC	Phage Artificial Chromosome
PBS	phosphate-buffered saline
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $H^{+}$ -Konzentration
pmol	Picomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S/MAR	scaffold/matrix-attached region
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde



---

SIDD	stress-induced duplex destabilization
ss	single/einzel-strängig
s.u. / s.o.	siehe unten / siehe oben
SV40	Simian Virus 40
T	Thymidin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tk	Thymidin-Kinase
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	units, Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslated Region
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)
YAC	Yeast Artificial Chromosome
z.B.	zum Beispiel

## 6. Literatur

**Adachi, Y., Kas, E., and Laemmli, U. K.** (1989). Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J* 8 (13), 3997-4006.

**Amatin, B., and Gasser, S. M.** (1990). Drosophila scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeast. *Mol Cell Biol* 10, 5442-5454.

**Amati, B., Pick, L., Laroche, T., and Gasser, S. M.** (1990). Nuclear scaffold attachment stimulates, but is not essential for ARS activity in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the *Drosophila* ftz SAR. *EMBO J* 9 (12), 4007-4016.

**Anderson, J. N.** (1986). Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures. *Nucleic Acids Res* 14 (21), 8513-8533.

**Archer, T. K., Cordingley, M. G., Wolford, R. G., and Hager, G. L.** (1991). Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol Cell Biol* 11 (2), 688-698.

**Armstrong, J. A., and Emerson, B. M.** (1998). Transcription of chromatin: these are complex times. *Curr Opin Genet Dev* 8 (2), 165-172.

**Baiker, A., Maercker, C., Piechaczek, C., Schmidt, S. B., Bode, J., Benham, C., and Lipps, H. J.** (2000). Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nat Cell Biol* 2 (3), 182-184.

**Benham, C. J.** (1993). Sites of predicted stress-induced DNA duplex destabilization occur preferentially at regulatory loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (7), 2999-3003.

**Benham, C. J.** (1996). Computation of DNA structural variability-a new predictor of DNA regulatory regions. *Comput Appl Biosci* 12 (5), 375-381.

**Benham, C., KohwiShigematsu, T., and Bode, J.** (1997). Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol* 274 (2), 181-196.

**Berezney, R., and Coffey, D. S.** (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Comm* 60, 1410-1417.

**Bode, J., Pucher, H. J., and Maass, K.** (1986). Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon- $\beta$  genes in a mouse host cell. *Eur J Biochem* 158, 393-401.

**Bode, J., and Maass, K.** (1988). Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 27, 4706-4711.

**Bode, J., and Hauser, H.** (1990). *Biologische Wirkungen und Induktionsmechanismen der Interferone*. Carl Hanser Verlag München, 63-100.

**Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr D., Mielke, C., and Kohwi-Shigematsu, T.** (1992). Biological Significance of Unwinding Capability of Nuclear matrix-Associating DNAs. *Science* 255, 195-197.

**Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V., and Klehr-Wirth, D.** (1995). Scaffold matrix-attached regions: Structural properties creating transcriptionally active loci. *Int Rev Cytol* 162A, 389-454.

**Bode, J., Bartsch, J., Boulikas, T., Iber, M., Mielke, C., Schübeler, D., Seibler, J., and Benham, C.** (1998). Transcription-promoting genomic sites in mammalia: their elucidation and architectural principles. *Gene Therapy and Molecular Biology* 1, 551-580.

**Bode, J., Benham, C., Knopp, A., and Mielke, C.** (2000). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10 (1), 73-90.

**Bode, J., Benham, C., Ernst, E., Knopp, A., Marschalek, R., Strick, R., and Strissel, P.** (2000). Fatal connections: When DNA ends meet on the nuclear matrix. *J Cell Biochem*, in Press.

**Bonifer, C., Yannoutsos, N., Krueger, G., Grosveld, F., and Sippel, A. E.** (1994). Dissection of the locus control function located on the chicken lysozym gene domein in transgenic mice. *Nucl Acids Res* 22, 4202-4210.

**Boulikas, T.** (1992). Homeotic protein binding sites, origins of replication, and nuclear matrix anchorage sites share the ATTA and ATTTA motifs. *J Cell Biochem* 50 (2), 111-123.

**Boulikas, T.** (1993). Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 52 (1), 14-22 .

**Boulikas, T.** (1994). Transcription factor binding sites in the matrix attachment region (MAR) of the chicken alpha-globin gene. *J Cell Biochem* 55 (4), 513-529.

**Boulikas, T.** (1995). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol* 162A, 279-388.

**Boulikas T.** (1996). Common structural features of replication origins in all life forms. *J Cell Biochem* 60 (3), 297-316 .

**Boulikas T., and Kong C. F.** (1993). Multitude of inverted repeats characterizes a class of anchorage sites of chromatin loops to the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 53 (1), 1-12 .

**Bullock, W. O.** et al. (1987). *Biotechniques* 5, 376-378.

**Burdon, R. H., Qureshi, M., and Adams, R. L. P.** (1985). Nuclear matrix-associated DNA methylase. *Biochem Biophys Acta* 825, 70-79.

**Carri, M. T., Micheli, G., Graziano, E., Pace, T., and Buongiorno-Nardelli, M.** (1986). The relationship between chromosomal origins of replication and the nuclear matrix during cell cycle. *Exp Cell Res* 164, 426-436.

**Chung, J. H., Whiteley, M., and Felsenfeld, G.** (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74 (3), 505-514.

**Cockerill, P. N.** (1990). Nuclear matrix attachment occurs in several regions of the IgH locus. *Nucleic Acids Res* 18 (9), 2643-2648.

**Cockerill, P. N., and Garrard, W. T.** (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44 (2), 273-282.

**Cockerill, P. N., Yuen, M. H., and Garrard, W. T.** (1987). The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J Biol Chem* 262 (11), 5394-5397.

**Davie, J. R.** (1998). Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev* 8 (2), 173-178.

**de Belle, I., Cai, S., and Kohwi Shigematsu, T.** (1998). The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) in vivo in Jurkat T cells are tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops. *J Cell Biol* 141 (2), 335-348.

**Diaz, M. O., Pomykala, H. M., Bohlander, S. K., Maltepe, E., Malik, K., Brownstein, B., and Olopade, O. I.** (1994). Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics* 22 (3), 540-552.

**Diaz, O. M.** (1995). The human type I interferon gene cluster. *Seminars in Virology* 6, 143-149.

**Dickinson, L. A., Joh, T., Kohwi, Y., and Kohwi-Shigematsu, T.** (1992). A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 70, 631-645.

**Dickinson, L. A., Dickinson, C. D., and Kohwi Shigematsu, T.** (1997). An atypical homeodomain in SATB1 promotes specific recognition of the key structural element in a matrix attachment region. *J Biol Chem* 272 (17), 11463-11470.

**Dietz, A., Kay, V., Schlake, T., Landsmann, J., and Bode, J.** (1994). A plant scaffold attached region detected close to a T-DNA integration site is active in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 22 (14), 2744-2751.

**Dijkwel, P. A., Wenink, P. W., and Poddighe, J.** (1986). Permanent attachment of replication origins to the nuclear matrix in BHK-cells. *Nucleic Acids Res* 14 (8), 3241-3249.

**Dijkwel, P. A., and Hamlin, J. L.** (1995). Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. Structural and Functional Organization of the Nuclear Matrix (Berezney, R., and Jeon, K. W., eds.) 162A, 455-484, Academic Press, San Diego.

**Driscoll, M. C., Dobkin, C. S., and Alter, B. P.** (1989). Gamma delta beta-thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5' beta-globin gene activation-region hypersensitive sites. Proc Natl Acad Sci USA 86 (19), 7470-7474.

**Dunaway, M., and Ostrander, E. A.** (1993). Local domains of supercoiling activate a eukaryotic promoter in vivo. Nature 361 (6414), 746-748.

**Duncan, R., Bazar, L., Michelotti, G., Tomonaga, T., Krutzsch, H., Avigan, M., and Levens, D.** (1994). A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. Genes Dev 8 (4), 465-480.

**Duncan, R., Collins, I., Tomonaga, T., Zhang, T., and Levens, D.** (1996). A unique transactivation sequence motif is found in the carboxyl-terminal domain of the single-strand-binding protein FBP. Mol Cell Biol 16 (5), 2274-2282.

**Ernst, E.** (2000) Lokalisierung und Analyse DNase I hypersensitiver Schnittstellen im menschlichen Typ I interferon-Gencluster. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.

**Evans, T., Schon, E., Gora-Maslak, G., Patterson, J., and Efstratiadis, A.** (1984). S1-hypersensitive sites in eukaryotic promotor regions. Nucleic acids research 12, 8043-8058.

**Fackelmayer, F. O., Dahm, K., Renz, A., Ramsperger, U., and Richter, A.** (1994). Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. Eur J Biochem 221 (2), 749-757.

**Felsenfeld, G., and McGhee, J. D.** (1986). Structure of the 30 nm chromatin fiber. Cell 44 (3), 375-377.

**Finch, J.T., and Klug, A.** (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. Proc Natl Acad Sci USA 73, 1897-1901.

**Fisher, P. A., Berrios, M., and Blobel, G.** (1982). Isolation and characterization of a proteinaceous subnuclear fraction composed of nuclear matrix, peripheral lamina and nuclear pore complexes from embryos of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 92, 674-686.

**Fleenor, D. E., and Kaufman, R. E.** (1993). Characterization of the DNase I hypersensitive site 3' of the human beta globin gene domain. *Blood* 81 (10), 2781-2790.

**Foster, K. A., and Collins, J. M.** (1985). The interrelation between DNA synthesis rates and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronized HeLa cells. *J Biol Chem* 260, 4229-4235.

**Forrester, W. C., Thompson, C., Elder, J. T., and Groudine, M.** (1986). A developmentally stable chromatin structure in the human beta-globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (5), 1359-1363.

**Forrester, W. C., Epner, E., Driscoll, M. C., Enver, T., Brice, T., Papyannopoulou, T., and Groudine, M.** (1990). A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. *Genes Dev* 4 (10), 1637-1649.

**Fraser, P., Pruzina, S., Antoniou, M., and Grosveld, F.** (1993). Each hypersensitive site of the human beta-globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes Dev* 7 (1), 106-113.

**Frengen, E., Weichenhan, D., Zhao, B., Osoegawa, K., van Geel, M., and de Jong, P. J.** (1999). A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics* 58 (3), 250-253.

**Friese, O.** (2000). Untersuchungen zur Chromatin-Domänenstruktur im humanen Interferon-Gencluster. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.

**Garrity, P. A., and Wold, B. J.** (1992). Effects of different DNA polymerases in ligation-mediated PCR: enhanced genomic sequencing and in vivo footprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (3), 1021-1025.

**Gasser, S. M., and Laemmli, U. K.** (1986). The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J* 5, 511-518.

**Gasser, S. M., and Laemmli, U. K.** (1986b). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 46 (4), 521-530.

**Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E., and Laemmli, U. K.** (1986). Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol* 188 (4), 613-629.

**Gasser, S. M., and Laemmli, U. K.** (1987). A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet* 3, 16-22.

**Giardina, C., Perez Riba, M., and Lis, J. T.** (1992). Promoter melting and TFIID complexes on *Drosophila* genes in vivo. *Genes Dev* 6 (11), 2190-2200.

**Gohring, F., and Fackelmayer, F. O.** (1997). The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* 36 (27), 8276-8283.

**Greener, A.** (1990). *Strategies* 3, 5.

**Gromova, I. I., Nielsen, O. F., and Razin, S. V.** (1995). Long-range fragmentation of the eukaryotic genome by exogenous and endogenous nucleases proceeds in a specific fashion via preferential DNA cleavage at matrix attachment sites. *J Biol Chem* 270 (31), 18685-18690.

**Grosveld, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R., and Kollias, G.** (1987). Position-independent, high level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* 51 (6), 975-985.

**Grunstein, M.** (1990). Nucleosomes: regulators of transcription. *Trends Genet* 6 (12), 395-400.

**Hall, Jr., G., Allen, G.C., Loer, D.S., Thompson, W.F., and Spiker, S.** (1991). Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9320-9324.



**Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

**Harland, R. M., Weintraub, H., and McKnight, S. L.** (1983). Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology. *Nature* 302 (5903), 38-43.

**Hauser, H., Gross, G., Brun, W., Hochkeppel, H.-K., Mayr, U., and Collins, J.** (1982). Inducibility of human  $\alpha$ -interferon gene in mouse L-cell clones. *Nature* 297, 650-654.

**Hebbes, T. R., Thorne, A. W., and Crane Robinson, C.** (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 7 (5), 1395-1402.

**Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., and Crane Robinson, C.** (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J* 13 (8), 1823-1830.

**Hendzel, M. J., Delcuve, G. P., and Davie, J. R.** (1991). Histone deacetylase is a component of the internal nuclear matrix. *J Biol Chem* 266 (32), 21936-21942.

**Hendzel, M. J., Sun, J. M., Chen, H. Y., Rattner, J. B., and Davie, J. R.** (1994). Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J Biol Chem* 269 (36), 22894-22901.

**Herrscher, R. F., Kaplan, M. H., Lelsz, D. L., Das, C., Scheuermann, R., and Tucker, P. W.** (1995). The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: a B cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes Dev* 9 (24), 3067-3082.

**HersHKovitz, M., and Riggs, A. D.** (1995). Metaphase chromosome analysis by ligation-mediated PCR: heritable chromatin structure and a comparison of active and inactive X chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (6), 2379-2383.

**HersHKovitz, M., and Riggs, A. D.** (1997). Ligation-mediated PCR for chromatin-structure analysis of interphase and metaphase chromatin. *Methods* 11 (2), 253-263.

**Higgs, D. R.** (1998). Do LCRs open chromatin domains?. *Cell* 95 (3), 299-302.

**Holstege, F. C., and Timmers, H. T.** (1997). Analysis of open complex formation during RNA polymerase II transcription initiation using heteroduplex templates and potassium permanganate probing. *Methods* 12 (3), 203-211.

**Homberger, H. P.** (1989). Bent DNA is a structural feature of scaffold-attached regions in *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. *Chromosoma* 98 (2), 99-104.

**Hornstra, I. K., and Yang, T. P.** (1993). In vivo footprinting and genomic sequencing by ligation-mediated PCR. *Anal Biochem* 213 (2), 179-193.

**Ide, H., Kow, Y. W., and Wallace, S. S.** (1985). Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks in vitro. *Nucleic Acids Res* 13 (22), 8035-8052.

**Inis, M., Gelfand, D., Snisky, J., and White, T.** (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, London.

**Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., and de Jong, P. J.** (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* 6 (1), 84-89.

**Isaacs, A., and Lindenman, J.** (1957). Virus interference. I. The interferone. *Proc R Soc Lond [Biol]* 147, 258-267.

**Janusch, H.** (1998). Definition funktioneller Gendomänen anhand von S/MAR-Mappierungen in vitro bzw. in vivo. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.

**Jarman, A. P., and Higgs, D. R.** (1988). Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *EMBO J* 7 (11), 3337-3344.

**Jenuwein, T., Forrester, W. C., Fernández-Herrero, L. A., Laible, G., Dull, M., and Grosschedl, R.** (1997). Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature (London)* 385, 269-271.

**Jeppesen, P., and Turner, B. M.** (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74 (2), 281-289.

**Kas, E., and Chasin, L. A.** (1987). Anchorage of the Chinese hamster dihydrofolate reductase gene to the nuclear scaffold occurs in an intragenic region. *J Mol Biol* 198 (4), 677-692.

**Kas, E., Izaurrealde, E., and Laemmli, U. K.** (1989). Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin. The role of oligo(dA).oligo(dT) tracts. *J Mol Biol* 210 (3), 587-599.

**Kas, E., and Laemmli, U. K.** (1992). In vivo topoisomerase II cleavage of the *Drosophila* histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics. *EMBO J* 11 (2), 705-716.

**Kay, V., and Bode, J.** (1995). Detection of Scaffold-Attached Regions (SARs) by In Vitro Techniques: Activities of These Elements In Vivo. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 186-194.

**Kayasuga-Mikado, K., Hashimoto, T., Negishi, T., Negishi, K., and Hayatsu, H.** (1980). Modification of Adenine and Cytosine Derivatives with Bromoacetaldehyde. *Chem Pharm Bull* 28 (3), 932-938.

**Kioussis, D., Vanin, E., deLange, T., Flavell, R. A., and Grosveld, F. G.** (1983). Beta-globin gene inactivation by DNA translocation in gamma beta-thalassaemia. *Nature* 306 (5944), 662-666.

**Kit, et al.** (1963). *Exp Cell Res* 31, 297-312.

**Klehr, D., Maass, K., and Bode, J.** (1991). Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* 30 (5), 1264-1270.

**Klehr, D., Schlake, T., Maass, K., and Bode, J.** (1992). Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* 31, 3222-3229.

**Kohwi, Y., and Kohwi Shigematsu, T.** (1988). Magnesium ion-dependent triple-helix structure formed by homopurine-homopyrimidine sequences in supercoiled plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (11), 3781-3785.

**Kohwi Shigematsu, T., and Nelson, J. A.** (1988). The chemical carcinogen, chloroacetaldehyde, modifies a specific site within the regulatory sequence of human cytomegalovirus major immediate early gene in vivo. *Mol Carcinog* 1 (1), 20-25.

**Kohwi-Shigematsu, T., and Kohwi, Y.** (1990). Torsional Stress Stabilizes Extended Base Unpairing in Suppressor Sites Flanking Immunoglobulin Heavy Chain Enhancer. *Biochemistry* 29, 9551-9560.

**Kohwi Shigematsu, T., Maass, K., and Bode, J.** (1997). A thymocyte factor SATB1 suppresses transcription of stably integrated matrix-attachment region-linked reporter genes. *Biochemistry* 36 (40), 12005-12010.

**Koo, H. S., Wu, H. M., and Crothers, D. M.** (1986). DNA bending at adenine . thymine tracts. *Nature* 320 (6062), 501-506.

**Kowalski, D.** (1984). Changes in site specificity of single-strand-specific endonucleases on supercoiled PM2 DNA with temperature and ionic environment. *Nucleic Acids Research* (12), 7071-7086.

**Kowalski, D., and Eddy, M. J.** (1989). The DNA unwinding element: a novel, cis-acting component that facilitates opening of the Escherichia coli replication origin. *EMBO J* 8 (13), 4335-4344.

**Kowalski, D., Natale, D. A., and Eddy, M. J.** (1988). Stable DNA unwinding, not "breathing," accounts for single-strand-specific nuclease hypersensitivity of specific A+T-rich sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (24), 9464-9468.

**Kowalski, D., and Sanford, J. P.** (1982). Action of Mung Bean Nuclease on Supercoiled PM2 DNA. *J Biol Chem* 13 (257), 7820-7825.

**Kruger, G., Huber, M. C., and Bonifer, C.** (1999). The -3.9 kb DNaseI hypersensitive site of the chicken lysozyme locus harbours an enhancer with unusual chromatin reorganizing activity. *Gene* 236 (1), 63-77 .

**Lagarkova, M. A., Iarovaia, O. V., and Razin, S. V.** (1995). Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *J Biol Chem* 270 (35), 20239-20241.

**Lewerenz, M., Mogensen, K. E., and Uze, G.** (1998). Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons. *J Mol Biol* 282 (3), 585-599.

**Lewis, C. D., Lebkowski, J. S., Daly, A. K., and Laemmli, U. K.** (1984). Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. *J Cell Sci* 1, 103-122.

**Lilley, D. M. J.** (1980). The inverted repeat as a recognizable structural feature in supercoiled DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (11), 6468-6472.

**Lim, V. I., and Mazanov, A. L.** (1978). *FEBS Letters* 88, 118-123.

**Liu, L. F., and Wang, J. C.** (1987). Supercoiling of DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (20), 7024-7027.

**Lowrey, C. H., Bodine, D. M., and Nienhuis, A. W.** (1992). Mechanism of DNase I hypersensitive site formation within the human globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (3), 1143-1147.

**Ludérus, M. E. E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J. L., Grande, M. A., de Jong, L., and van Driel, R.** (1992). Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 70, 949-959.

**Ludérus, M. E. E., Den Blaauwen, J. L., De Smit, O. J. B., Compton, D. A., and Van Driel, R.** (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14, 6297-6305.

**Marie, I., Durbin, J. E., and Levy, D. E.** (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* 17 (22), 6660-6669.

**Mattern, K. A., Humbel, B. M., Muijsers, A. O., de Jong, L., and van Driel, R.** (1996). hnRNP proteins and B23 are the major proteins of the internal nuclear matrix of HeLa S3 cells. *J Cell Biochem* 62 (2), 275-289.

**Maxam, A. M., and Gilbert, W.** (1980). Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* 65, 499-560.

**McKnight, R. A., Shamay, A., Sankaran, L., Wall, R. J., and Hennighausen, L.** (1992). Matrix-attachment regions can impart position-dependent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6943-6947.

**McNamara, P. T., Bolshoy, A., Trifonov, E. N., and Harrington, R. E.** (1990). Sequence-dependent kinks induced in curved DNA. *J Biomol Struct Dyn* 8 (3), 529-538.

**Michalowski, S. M., Allen, G. C., Hall, Jr. G. E., Thompson, W. F., and Spiker, S.** (1999). Characterization of randomly-obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants. *Biochemistry* 38 (39), 12795-12804.

**Michelotti, G. A., Michelotti, E. F., Pullner, A., Duncan, R. C., Eick, D., and Levens, D.** (1996). Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human c-myc gene in vivo. *Mol Cell Biol* 16 (6), 2656-2669.

**Mielke C., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T., and Bode, J.** (1990). Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: Correlations of properties in vitro and function in vivo. *Biochemistry* 29, 7475-7485.

**Mielke, C., Benham, C., Bode, J., and Breindl, M.** (2000). Multiple collagen I gene regulatory elements have sites of stress-induced DNA duplex destabilization and nuclear scaffold/matrix association potential. *Mol Cell Biol*, submitted.

**Miller, T. W., Huang, C.-Y., and Pogo, A. O.** (1978). Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing hnRNA. *J Cell Biol* 76, 675-691.

**Mirkovitch, J., Mirault, M. E., and Laemmli, U. K.** (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 39, 223-232.

**Mirkovitch, J., Gasser, S. M., and Laemmli, U. K.** (1988). Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J Mol Biol* 200 (1), 101-109.

**Moura Gallo, C. V. D., Vassetzky, Y. S., Huesca, M., and Scherrer, K.** (1992). A transcription-dependent DNase I-hypersensitive site in a far upstream segment of the chicken Alpha-globin gene domain coincides with a matrix attachment region. *Biochem Biophys Res Comm* 184, 1226-1234.

**Mueller, P. R., and Wold, B.** (1989). In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR [published erratum appears in Science 1990 May 18;248(4957):802]. *Science* 246 (4931), 780-786.

**Murphy, L. C., Huzel, N., and Davie, J. R.** (1996). Novel DNase I hypersensitive sites in the 3'-flanking region of the human c-myc gene. *DNA Cell Biol* 15 (7), 543-548.

**Nakagomi, K., Kohwi, Y., Dickinson, L. A., and Kohwi Shigematsu, T.** (1994). A novel DNA-binding motif in the nuclear matrix attachment DNA-binding protein SATB1. *Mol Cell Biol* 14 (3), 1852-1860.

**Namciu, S. J., Blochlinger, K. B., and Fournier, R. E.** (1998). Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 18 (4), 2382-2391.

**Nayler, O., Stratling, W., Bourquin, J. P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A. M., Fackelmayer, F. O., Ullrich, A., and Stamm, S.** (1998). SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res* 26 (15), 3542-3549.

**Paul, A. L., and Ferl, R. J.** (1998). Higher order chromatin structures in maize and Arabidopsis. *Plant Cell* 10 (8), 1349-1359.

**Paulson, J. R., and Laemmli, U. K.** (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-828.

**Phi-van, L., and Strätling, W. H.** (1988). The matrix attachment regions of the chicken lysozym gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J* 7, 655-664.

**Pierce, J. C., Sauer, B., and Sternberg, N.** (1992). A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system: improved cloning efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (6), 2056-2060.

**Pomykala, H. M., Bohlander, S. K., Broeker, P. L., Olopade, O. I., and Diaz, M. O.** (1994). Breakpoint junctions of chromosome 9p deletions in two human glioma cell lines. *Mol Cell Biol* 14 (11), 7604-7610.

**Ramirez-Solis, R. Davis, A. C., and Bradley, A.** (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 225, 855-878.

**Razin, S. V., Shen, K., Ioudinkova, E., and Scherrer, K.** (1999). Functional analysis of DNA sequences located within a cluster of DNase I hypersensitive sites colocalizing with a MAR element at the upstream border of the chicken alpha-globin gene domain. *J Cell Biochem* 74 (1), 38-49 .

**Renz, A., and Fackelmayer, F. O.** (1996). Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res* 24 (5), 843-849.

**Richard-Foy, H., and Hager, G. L.** (1987). Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV-promotor. *EMBO J* 6 (8), 2321-2328.

**Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A.** (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature (London)* 311, 532-537.

**Roberts, R. M., Liu, L., Guo, Q., Leaman, D., and Bixby, J.** (1998). The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* 18 (10), 805-816.

**Romig, H., Fackelmayer, F. O., Renz, A., Ramsperger, U., and Richter, A.** (1992). Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J* 11 (9), 3431-3440.

**Rubin, C. M., and Schmid, C. W.** (1980). Pyrimidine-specific chemical reactions useful for DNA sequencing. *Nucleic Acids Research* 8, 4613-4619.



**Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.

**Samuel, S. K., Spencer, V. A., Bajno, L., Sun, J. M., Holth, L. T., Oesterreich, S., and Davie, J. R.** (1998). In situ cross-linking by cisplatin of nuclear matrix-bound transcription factors to nuclear DNA of human breast cancer cells. *Cancer Res* 58 (14), 3004-3008.

**Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

**Sasse, Dwight S., and Gralla, J. D.** (1989). KMnO<sub>4</sub> as a probe for lac promoter DNA melting and mechanism in vivo. *J Biol Chem* 264 (14), 8074-8081.

**Schoenlein, P. V., Barrett, J. T., and Welter, D.** (1999). The degradation profile of extra-chromosomal circular DNA during cisplatin-induced apoptosis is consistent with preferential cleavage at matrix attachment regions. *Chromosoma* 108 (2), 121-131.

**Schon, E., Evans, T., Welsh, J., and Efstratiadis, A.** (1983). Conformation of Promotor DNA: Fine Mapping of S1-hypersensitive Sites. *Cell* 35, 837-848.

**Schubeler, D., Mielke C., Maass K., and Bode J.** (1996). Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry* 35 (34), 11160-11169.

**Seibler, J.** (1999). Sequenzspezifische Rekombination zur gezielten Manipulation des Mammaliagenoms. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.

**Sheflin, L. G., and Kowalski, D.** (1984). Mung bean nuclease cleavage of a dA + dT-rich sequence or an inverted repeat sequence in supercoiled PM2 DNA depends on ionic environment. *Nucleic Acids Research* (12), 7087-7104.

**Simpson, R. T.** (1986). Nucleosome positioning in vivo and in vitro. *Bioessays* 4 (4), 172-176.

**Singleton, C. K., Klysik, J., Stirdivant, S. M., and Wells, R. D.** (1982). Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions. *Nature* 299 (5881), 312-316.

**Singleton, C. K., Kilpatrick, M. W., and Wells, R. D.** (1984). S1 nuclease recognizes DNA conformational junctions between left-handed helical (dT-dG n. dC-dA)<sub>n</sub> and contiguous right-handed sequences. *J Biol Chem* 259 (3), 1963-1967.

**Singh, G. B., Kramer, J. A., and Krawetz, S. A.** (1997). Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res* 25 (7), 1419-1425.

**Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* 98, 503-517.

**Spencer, C. A., and Groudine, M.** (1990). Transcription elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene* 5 (6), 777-785.

**Stamatoyannopoulos, J. A., Goodwin, A., Joyce T., and Lowrey, C. H.** (1995). NF-E2 and GATA binding motifs are required for the formation of DNase I hypersensitive site 4 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J* 14 (1), 106-116.

**Stief, A., Winter, D. M., Stratling, W. H., and Sippel, A. E.** (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 341 (6240), 343-345.

**Strissel, P. L., Dann, H. A., Pomykala, H. M., Diaz, M. O., Rowley, J. D., and Olopade, O. I.** (1998). Scaffold-associated regions in the human type I interferon gene cluster on the short arm of chromosome 9. *Genomics* 47 (2), 217-229.

**Targa, F. R., Razin, S. V., Moura Gallo, C. V. De, and Scherrer, K.** (1994). Excision close to matrix attachment regions of the entire chicken Alpha-globin gene domain by nuclease S1 and characterization of the framing structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4422-4426.

**Thoma, F.** (1988). The role of histone H1 in nucleosomes and chromatin fibers. *Architecture of eukaryotic genes* (G. Kahl, Ed.). 163; VCH, Weinheim.

**Travers, A. A.** (1987). DNA bending and nucleosome positioning. *Trends Biochem Sci* 12, 108-112.

**Trifonov, E. N.** (1986). Curved DNA. *Critical Reviews of Biochemistry* 19 (2), 89-106.

**Trifonov, E. N.** (1980). Sequence-dependent deformational anisotropy of Chromatin DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4041-4053.

**Tsao, Y. P., Wu, H. Y., and Liu, L. F.** (1989). Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell* 56 (1), 111-118.

**Tsutsui, K., Tsutsui, K., Okada, S., Watarai, S., Seki, S., Yasuda, T., and Shohmori, T.** (1993). Identification and characterization of a nuclear scaffold protein that binds the matrix attachment region DNA. *J Biol Chem* 268 (17), 12886-12894.

**Tsutsui, K.** (1998). Synthetic concatemers as artificial MAR: importance of a particular configuration of short AT-tracts for protein recognition. *Gene Ther Mol Biol* 1, 581-590.

**Valentine, J. E., and Sewell, W. A.** (1998). Characterisation of inducible DNase I hypersensitive sites flanking the human interleukin-5 gene. *Biochim Biophys Acta* 1442 (2-3), 218-229.

**Valkov, N. I., Gump, J. L., Engel, R., and Sullivan, D. M.** (2000). Cell density-dependent VP-16 sensitivity of leukaemic cells is accompanied by the translocation of topoisomerase IIalpha from the nucleus to the cytoplasm. *Br J Haematol* 108 (2), 331-345.

**vanDrunen, C. M., Sewalt, R. G. A. B., Oosterling, R. W., Weisbeek, P. J., Smeekeens, S. C. M., and vanDriel, R.** (1999). A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucl Acid Res* 27 (14), 2924-2930.

**Venter, J. C., Smith, H. O., and Hood, L.** (1996). A new strategy for genome sequencing [see comments]. *Nature* 381 (6581), 364-366.

**Vilcek, and Havel** (1973). *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 3909-3913.

**Villeponteau, B., Lundell, M., and Martinson, H.** (1984). Torsional Stress Promotes the DNase I Sensitivity of Active Genes. *Cell* 39, 468-478.

**Voet, D., Voet, G. J.** (1992) *Biochemie*. Kap.28-5, VCH, Weinheim.

**von Kries, J. P., Buhrmester, H., and Stratling, W. H.** (1991). A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell* 64 (1), 123-135.

**Wade, P. A., Pruss, D., and Wolffe, A. P.** (1997). Histone Acetylation: chromatin in action. *TIBS* 22, 128-132.

**Weighardt, F., Cobianchi, F., Cartegni, L., Chiodi, I., Villa, A., Riva, S., and Biamonti, G.** (1999). A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J Cell Sci* 112 ( Pt 10), 1465-1476.

**Weintraub, H., Cheng, P. F., and Conrad, K.** (1986). Expression of transfected DNA depends on DNA topology. *Cell* 46 (1), 115-122.

**Weitzel, J. M., Buhrmester, H., and Stratling, W. H.** (1997). Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Mol Cell Biol* 17 (9), 5656-5666.

**Wijgerde, M., Grosveld, F., and Fraser, P.** (1995). Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. *Nature* 377 (6546), 209-213.

**Wolffe, A. P., and Pruss, D.** (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84 (6), 817-819.

**Zehnbauer, B., and Vogelstein, B.** (1986). Supercoiled loops and the organization of replication and transcription in eukaryotes. *BioEssays* 2, 52-54.

**Zeng, C., He, D., and Brinkley, B. R.** (1994) Localization of NuMA protein isoforms in the nuclear matrix of mammalian cells. *Cell Mobility Cytoskel* 29, 167-176

**Zeng, C., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Meyers, S., Sun, W., Shopland, L., Lawrence, J. B., Penman, S., Lian, J. B., Stein, G. S., and Hiebert, S. W.** (1997). Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML/CBF-alpha transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (13), 6746-6751.

## 7. Anhang

### Liste der bearbeiteten Cosmid-Klone

Die Klone stammen aus der „Chromosom 9 Cosmid Library LL09NC01 (P)“. Diese Bank wurde von J. Alleman und Kollegen im Human Genome Center des Lawrence Livermore National Laboratory, Biochemical Sciences Division; Livermore, CA 94550 konstruiert. Das Arbeit war Teil des National Laboratory Gene Library Project und wurde gefördert vom U.S Department of Energy.

Klon-Name	Interne vorhandene Informationen Nomenklatur	
P29D2	cosI10	
P133D4	cosI54	IFN $\alpha$ 1 im Insert
P189C9	cosI65	IFN $\alpha$ 1 im Insert
P252A12	cosI98	
P299C6	cosI125	Insert deletiert
P19H7	cosI7	
P49D4	cosI16	IFN $\alpha$ 13 im Insert
P50E5	cosI17	IFN $\alpha$ 1 im Insert
P55D3	cosI19	IFN $\alpha$ 14 im Insert
P64F3	cosI27	
P213H2	cosI74	
P216C12	cosI76	IFN $\alpha$ 1 im Insert
P217E4	cosI78	
P257A8	cosI102	
P278G12	cosI114	
P61C5	cosI23	identisch zu Klon P61E8
P61E8	cosI24	
P242G2	cosI89	
P39C11	cosII1	
P39D3	cosII2	
P66E2	cosII3	
P97C6	cosII4	
P97C8	cosII5	
P121B9	cosII6	
P121G11	cosII7	Lokalisiert zw. IFN $\alpha$ 10 und IFN $\alpha$ 7
P137C5	cosII8	
P137E6	cosII9	IFN $\alpha$ 14 im Insert
P55G11	cosII10	
P156A8	cosII11	
P162F5	cosII12	IFN $\alpha$ 2 im Insert
P231D3	cosII13	
P238G7	cosII14	
P238G10	cosII15	
P246C12	cosII16	
P259D11	cosII17	

P275E7 cosII18

P282D7 cosII19

P300F8 cosII20

Klonierungsvektor heißt *LAWRIST16*; Acc.Nr.L19898**Liste der bearbeiteten PAC-Klone**

Die Klone stammen aus der PAC-Bank „RPC11,3-5" und wurden in Heidelberg am Ressourcen-Zentrum anhand von Cosmid-Proben identifiziert. Die PAC-Bank wurde am Roswell Park Cancer Institute von Dr. P.deJong und P.Ioannou konstruiert.

Klon-Name	interne Nomenklatur	Bemerkung
dJ786P03	C5	
dJ527I03	B2	
dJ1133G22	D3	
dJ582I01	C1	
dJ554I24	B6	
dJ530H12	B3	
dJ537C19	B5	
dJ537C18	B4	
dJ708F10	C2	
dJ290M06	A6	
dJ813L02	C6	
dJ1135B04	D4	
dJ278F18	A5	
dJ18B23	A1	deletiert
dJ164G02	A4	deletiert
dJ164E12	A3	
dJ777N17	C3	entspricht exakt C4
dJ777P21	C4	
dJ992E19	D2	
dJ129B10	A2	deletiert
dJ510K12	B1	deletiert
dJ791A08	E1	Klone E1 bis E13 enthalten Insert aus dem centromerem Clusterbereich
dJ910M11	E2	
dJ547L18	E3	
dJ889J09	E4	
dJ868C20	E5	
dJ1165L10	E6	
dJ290D05	E7	
dJ1023O13	E8	
dJ868D21	E9	
dJ1134E21	E10	
dJ679A18	E11	
dJ95M03	E12	
dJ548G09	E13	

Klonierungsvektor heißt *pCYPAC2*; Acc.Nr.U09128

### Liste der bearbeiteten BAC-Klone

Die Klone Bac1 und Bac2 (bA...) stammen aus der BAC-Bank RPCI11 und wurden am Roswell Park Cancer Institute in der Gruppe von P.deJong kloniert. Die Klone Bac3 bis Bac6 (bK...) stammen aus der BAC-Bank CIT-HSP und wurden von M.Wang freundlicherweise von der Fa.CalTech zur Verfügung gestellt.

Klon-Name	interne Nomenklatur	Bemerkung
bA1P8	Bac1	Start 3,5 kbp 3' von IFN $\alpha$ -Gen in Richtung des Gens
bA1004O20	Bac2	
bK2375N23	Bac3	Start im IFN $\alpha$ 4-Gen
bK3070O20	Bac4	Start im IFN $\alpha$ P22-Gen
bK2332M21	Bac5	Start 10 kbp 3' von IFN $\alpha$ -Gen
bK2360P22	Bac6	Start 200 bp 3' von IFN $\alpha$ -Gen

Klonierungsvektor von RPCI11-Klonen heißt *pBACe3.6*; Acc.Nr.U80929

Klonierungsvektor von CIT-HSP-Klonen heißt *pBeloBac11*; Acc.Nr.U51113

### Plasmide

Die Plasmide pCl, pTZE20 und pTZE2.2 enthalten S/MAR-Elemente aus dem humanen Interferon-Gencluster. Der Klonierungsvektor ist pTZ18R; Acc.Nr. L08956.

Das Plasmid pCl enthält das S/MAR800-Fragment - ein Teilfragment des EcoRI-Fragmentes E des 5'S/MARs der IFN $\alpha$ -Domäne (Mielke et al., 1990).

Das Plasmid pTZE20 enthält das gesamte EcoRI-Fragment E des 5'S/MARs der IFN $\alpha$ -Domäne, einkloniert in die EcoRI-Schnittstelle der Multikloning-Site des Klonierungsvektors Mielke et al. 1990).

Das Plasmid pTZE2.2 enthält ein EcoRI-Fragment aus dem intergenen Bereich 3' vom IFN $\alpha$ 1-Gen (Frieze, 1999).